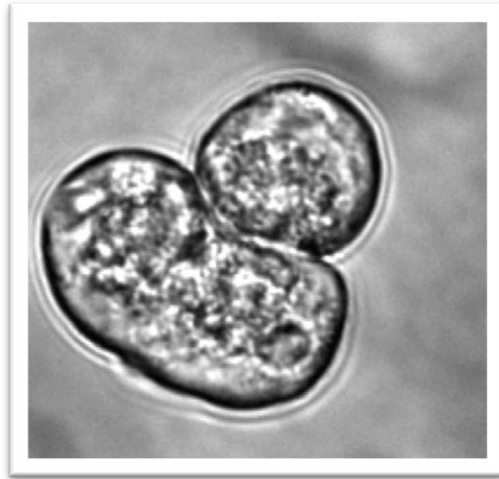


**ALTERACIONES FISIOPATOLÓGICAS
TEMPRANAS ASOCIADAS A PANCREATITIS
CRÓNICA EN CÉLULAS ACINARES
PANCREÁTICAS:
MECANISMOS DE RESPUESTA FRENTE A TÓXICOS**



Tesis Doctoral

María Luaces Regueira

Departamento de Medicina

Santiago de Compostela, 2013

D. J. Enrique Domínguez Muñoz, Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela y Jefe de Servicio del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela,

Certifica:

Que la presente Tesis Doctoral titulada: **“Alteraciones fisiopatológicas tempranas asociadas a pancreatitis crónica en células acinares pancreáticas: mecanismos de respuesta frente a tóxicos”** que presenta María Luaces Regueira ha sido realizada bajo su dirección en el Laboratorio de Gastroenterología en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada para optar al grado de Doctor en la Universidad de Santiago de Compostela.

Revisado el mismo, queda conforme con su presentación para ser juzgado como Tesis Doctoral por el correspondiente tribunal.

Para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado

Prof. J. Enrique Domínguez Muñoz

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Domínguez, el jefe, porque sin él nada de esto hubiese sido posible. Gracias por darme la oportunidad de entrar en este gran grupo de investigación y haber aprendido tanto durante todos estos años. Porque sin su ayuda no hubiese llegado hasta aquí, gracias.

Agradecer a todo el equipo de investigación del Servicio de Gastroenterología (Ana, Manu, Rocío, Mari, Susana, ...) su apoyo en reuniones, en congresos, trato con pacientes, Gracias. En particular quiero dar las gracias a mis compañeras de FIENAD, Laura y Marta, por vuestro apoyo y ayuda tanto a nivel personal como profesional, gracias por esos ánimos en los momentos de agobio, por esas tardes pasando datos, por esos distendidos cafés y amenas comidas “de trabajo”.

Quiero agradecer especialmente a Paula y a Julio su apoyo continuo. A Julio, más a nivel profesional, porque de él he aprendido un montón de páncreas y de endoscopia!. Siendo bióloga considero que ya tengo una formación en las técnicas ecoendoscópicas más que suficiente!. Gracias por tu ayuda siempre que la he necesitado. Paula, qué decir de Paula, gracias por todo, a nivel personal y laboral. Gracias por aguantarme en mis días buenos y no tan buenos, por ayudarme siempre con cualquier gestión, por aguantar mis agobios, por esos cafés mañaneros, ... Gracias.

A Lari, por su apoyo en los congresos, por aguantarme cuando estaba histérica por tener que hablar en público o por tener que montarme en un avión.

Quiero agradecer también la ayuda de todos los investigadores del Instituto de Investigaciones Sanitarias del Hospital (Laboratorio de Nefro, Cardio, Reuma, Endocrino, Onco, Proteómica, Confocal, ...). Me habéis aportado un montón de conocimientos sobre trabajo de investigación. Gracias.

A mi tío Tabo, por las largas tardes de ayuda, enseñándome a medir los niveles de secreción enzimática en el laboratorio y por muchas otras lecciones de la ciencia en general. Gracias.

A mis “ayudantes temporales” de laboratorio, Amaia, María y Dani, por echarme una mano en los trabajo experimental.

Sisi, mi tutora, muchísimas gracias. De ti he aprendido mucho, y espero seguir aprendiendo, porque aún me queda mucho para llegar a parecerme a ti, eres una excelente investigadora, un ejemplo a seguir. Gracias por tu ayuda constante, por aguantarme en mis malos días y por ayudarme a corregir este trabajo.

Marga, te considero una gran compañera y una gran profesional, de hecho la mejor que me podría haber tocado. Gracias por ayudarme en este proyecto de principio a fin. Gracias por aconsejarme cuando no veía el camino claro de la línea de trabajo, ayudarme cuando no me daban los tiempos en el laboratorio para hacer tres cosas a la vez, apoyarme en mis momentos de agobio absoluto, aguantarme en mis malos (y muy malos días), que no fueron pocos. Y, por supuesto, gracias por esa vida extralaboral que ha consolidado nuestra amistad.

A mis superamigas Laura, Sandra y Laura, porque me han acompañado a lo largo de todo este tiempo desde el principio de mi carrera. Gracias por los años juntas vividos en Santiago, indescriptibles e inolvidables, repletos de cosas buenas. Y aunque ahora nos veamos menos para mí siempre seréis las mismas, sé que os tengo ahí. Gracias.

A mis amigas, a las de toda la vida, Nuria, Fany, Iria y Natalia, ya las que se han ido incorporando a lo largo del camino, Ana, Eva, María, y a mis amigos-familia de la “otra parte”. Gracias.

A mi familia, especialmente a mis abuelos, porque de ellos he aprendido un montón a lo largo de mi vida y el cariño que ellos me han proporcionado es especial e indescriptible.

A mi madrina, porque ella fue la que me inculcó mi interés por la biología, pero no por eso, por mucho más, por todo. Por su amistad, su apoyo y su ayuda. Gracias por estar ahí siempre.

A mi hermano, porque aunque es “el pequeño” siempre me he sentido totalmente protegida por él y aunque haya temporadas que nos vemos más y otras menos, su apoyo siempre es constante. Gracias.

A Emilio, gracias por todo, no pude haber encontrado mejor persona que tú para compartir mi vida. Gracias por estar conmigo en el día a día, por aguantar en casa los problemas que algunos días, no pocos, me traigo del trabajo, gracias por aguantar mis cambios de humor debido al estrés. Gracias por hacer que a tu lado todo sea más fácil, por “mimarme” y cuidarme de manera incondicional.

Mamá y papá, no tengo palabras para agradecerlos todo lo que habéis hecho por mí. Sin vosotros sí que realmente nada de esto hubiese sido posible. Gracias por la educación que me habéis dado a lo largo de las diferentes etapas de mi vida, sin duda la mejor. Sois los mejores padres del mundo y un ejemplo a seguir, espero siempre parecerme lo máximo posible a vosotros. Tengo el orgullo de decir que además de mis padres sois mis amigos y quiero agradecerlos el apoyo y la confianza que siempre habéis depositado en mí. No sabéis cuanto os quiero. Gracias.

ACRÓNIMOS

AMPc: AMP cíclico

APS: Amonium Persulfato

BSA: bovine serum albumin

Ca²⁺: calcio

CCK: colecistokinina

CFTR: gen de la fibrosis quística (cystic fibrosis transmembrane regulator)

DAG: diacilglicerol

DCFDA: Diacetato de diclorodihidrofluoresceína.

DMEM: Dulbeco modified Egle Medium

GPCR: receptor acoplado a proteínas G

IKB: inhibidor de NFκB.

Il1β: Interleukina 1 beta

JNK: Kinasa c-Jun N-terminal

LDH: lactato deshidrogenasa

NFκB: factor de transcripción potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

PBS: phosphate buffer saline

PLC: fosfolipasa C

PRSS1: gen del tripsinógeno catiónico

RER: retículo endoplasmático rugoso

ROS: especies reactivas del oxígeno

SDS: Sodio Dodecil Sulfato

SNARE: soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor.

SPINK-1: serine protease inhibitor Kazal-type 1

TNF- α : tumor necrosis factor α (factor de necrosis tumoral α)

λ : lambda

ÍNDICE

ÍNDICE	Pág.
ACRÓNIMOS	9
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. Páncreas	19
1.2. Páncreas exocrino: Célula acinar	23
1.2.1. Mecanismos de síntesis y activación enzimática en la célula acinar	24
1.2.2. Mecanismo de secreción enzimática	26
1.2.3. Homeostasis del calcio	30
1.2.4. Expresión y secreción de moléculas implicadas en el proceso inflamatorio.	32
1.3. Pancreatitis Crónica	34
1.3.1. Definición y características clínicas	34
1.3.2. Etiología	35
1.4. Fisiopatogenia de la pancreatitis crónica y célula acinar	41
1.4.1. Activación enzimática intracelular prematura	42
1.4.2. Papel del calcio en la fisiopatología de la pancreatitis crónica	45
1.4.3. Alteración de la secreción enzimática	46
1.4.4. Desarrollo del proceso inflamatorio	47
1.4.5. Estrés celular: producción de especies reactivas del oxígeno	49
1.4.6. Muerte celular: necrosis y apoptosis	51
1.5. Papel de los factores tóxicos sobre los eventos fisiopatogénicos asociados a la Pancreatitis Crónica	54
1.5.1. Papel del alcohol en la Pancreatitis Crónica	55
1.5.2. Papel del tabaco en la Pancreatitis Crónica	57
2. HIPÓTESIS	61
3. OBJETIVOS	65

4. MATERIALES Y MÉTODOS	69
4.1. Animales de experimentación	71
4.2. Reactivos alcohol y tabaco	71
4.3. Aislamiento de células acinares pancreáticas	72
4.3.1. Optimización del método	76
4.4. Actividad enzimática intracelular	78
4.5. Análisis de la secreción de enzimas pancreáticas	83
4.6. Análisis de los niveles de calcio intracelulares	86
4.7. Estudio del proceso inflamatorio	89
4.7.1. Activación del factor de transcripción NFKappaB	89
4.7.2. Secreción de interleukina 1 beta	96
4.8. Análisis de la producción de especies reactivas del oxígeno	98
4.9. Estudio de muerte celular en células acinares pancreáticas.	101
4.9.1. Necrosis	101
4.9.2. Citotoxicidad	104
4.9.3. Apoptosis	107
4.10. Consideraciones éticas	111
5. RESULTADOS	113
5.1. Optimización del método de aislamiento de células acinares pancreáticas	115
5.2. Efecto del tabaco y el alcohol en la activación intracelular de las enzimas pancreáticas.	119
5.2.1. Activación de tripsina	120
5.2.2. Activación de elastasa	123
5.3. Alteración de los niveles de calcio intracelulares en respuesta al tabaco y al alcohol.	126
5.4. Efecto del tabaco y el alcohol en la secreción de enzimas pancreáticas.	129
5.4.1. Secreción de amilasa	130
5.4.2. Secreción de lipasa	132

5.5.	Efecto del tabaco y del alcohol en el desarrollo del proceso inflamatorio.	135
5.5.1.	Activación de NFKappaB	135
5.5.2.	Secreción de Interleukina 1 beta	138
5.6.	Estrés celular en respuesta al tabaco y al alcohol: producción de especies reactivas del oxígeno.	141
5.7.	Muerte celular en respuesta al tabaco y al alcohol.	144
5.7.1.	Necrosis celular	145
5.7.2.	Citotoxicidad	147
5.7.3.	Apoptosis	148
6.	DISCUSIÓN	153
7.	CONCLUSIONES	169
8.	PERSPECTIVAS DE FUTURO	173
9.	BIBLIOGRAFÍA	177

1.INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL PÁNCREAS

El páncreas es un órgano situado en el retroperitoneo que posee una estructura lobular. Se encuentra en la parte media del abdomen y posterior e inferior del estómago, en íntimo contacto con la porción superior de este órgano, unido al duodeno en la zona de la cabeza y al bazo en la zona de la cola (fig. 1). En el adulto el páncreas presenta una longitud que oscila entre 15 y 25 cm y un peso entre 70 y 150 gramos. El canal pancreático principal lo constituye el conducto de Wirsung, que mide aproximadamente 12 cm y se une a la vía biliar principal al nivel de la Papila de Vater (Tortora et al., 2006).

El páncreas se divide en 4 partes bien diferenciadas: cabeza, cuerpo, cola y proceso uncinado. La cabeza se encuentra dentro de la curvatura que forma el duodeno, es decir, dentro del asa duodenal. En la parte inferior de la cabeza, el conducto pancreático principal se une al conducto colédoco dando lugar a la ampolla hepatopancreática o de Vater que se introduce en el duodeno descendente. El cuerpo continúa posterior al estómago hacia la derecha y ascendiendo ligeramente. Finalmente la cola termina tras pasar entre las capas del ligamento esplenorrenal (Tortora et al., 2006).

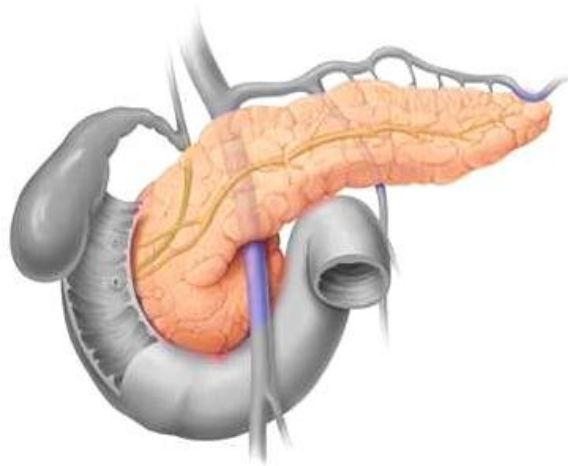


Fig. 1. Estructura y localización del páncreas

Irrigación e inervación: Esta glándula posee una compleja irrigación desde la aorta abdominal. La cabeza está irrigada por el tronco celíaco y por la arteria mesentérica superior. El cuerpo y la cola están irrigados por la arteria esplénica y sistema portal. Con respecto a la inervación, este órgano está innervado por las raíces nerviosas que emergen en la parte alta del retroperitoneo.

Histología y citología: Histológicamente en el páncreas se pueden distinguir dos tipos de tejido: el exocrino y el endocrino (Ross et al., 2007), desempeñando cada uno sus correspondientes funciones y con tipos celulares bien diferenciados.

La **parte exocrina** contiene glándulas con forma de racimo, los llamados acinos pancreáticos (fig. 2), con forma redonda u ovalada presentando células acinares dispuestas en forma piramidal y células epiteliales. Las células acinares son las encargadas de secretar las enzimas digestivas en su forma inactiva. Los conductos que forman estos racimos están formados por células ductales con la función de neutralizar los ácidos del estómago mediante la secreción de bicarbonato al duodeno (Guyton, 2009).

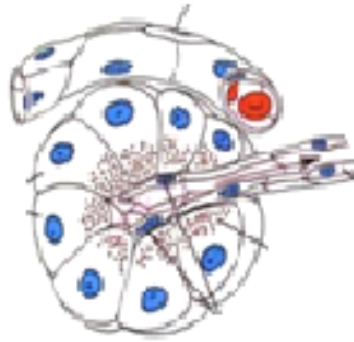


Fig. 2. Estructura de un acino pancreático

Otro grupo interesante de células recientemente descubiertas, son las células estrelladas pancreáticas. Estas células en su forma quiescente se encuentran cerca de los vasos endoteliales, pero cuando se activan en respuesta a un proceso inflamatorio adquieren forma triangular (estrellada) y alcanzan una localización periacinar. En su forma activada desenvuelven un papel en la progresión de la inflamación y en el desarrollo de fibrosis (Apte MV. Et al, 1998).

La **parte endocrina** constituye el 1-2% del páncreas adulto y se agrupa en los llamados Islotes de Langerhans (fig. 3), que están compuestos por varios tipos celulares. Las células alfa sintetizan y liberan glucagón (20-25%) y se distribuyen de forma periférica; las células beta producen y liberan insulina (60-75%); y las células delta producen somatostatina.

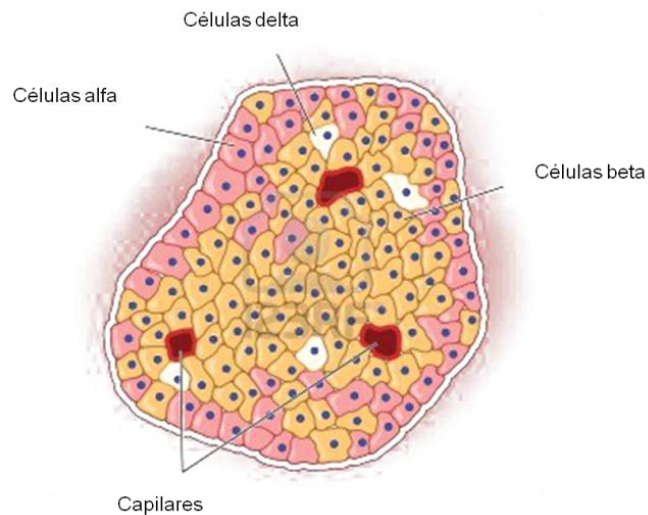


Fig. 3. Islote de Langerhans

Funcionalidad: La principal función del páncreas es participar en el proceso de la digestión de los nutrientes provenientes de la dieta; esta función la lleva a cabo a través de dos vías, la exocrina encargada de la secreción del jugo pancreático, y la endocrina responsable de la liberación de diversas hormonas al torrente sanguíneo.

El **jugo pancreático** es un líquido más o menos viscoso que consta de un componente acuoso, rico en bicarbonato, que ayuda a neutralizar el contenido duodenal, y un componente enzimático, que contiene enzimas para la digestión de proteínas, carbohidratos y grasas. La secreción exocrina del páncreas está controlada por señales nerviosas y hormonales originadas por la presencia de ácido y productos de digestión en el duodeno (Ross et al., 2007). La secretina y la colecistoquinina son dos hormonas que se secretan en esta situación y desempeñan un papel determinante en la funcionalidad del páncreas. La *secretina* estimula la secreción del componente acuoso, y la *colecistoquinina* estimula la secreción de las enzimas pancreáticas.

1.2. PÁNCREAS EXOCRINO: CÉLULA ACINAR

Las células acinares pancreáticas constituyen alrededor del 80% del total de los tipos celulares del páncreas. Estas células se encuentran agrupadas en forma de racimos llamados **acinos pancreáticos**, que son las unidades funcionales del páncreas exocrino. Las células acinares (fig. 4) están diseñadas para sintetizar, almacenar y secretar enzimas pancreáticas a través del conducto pancreático al duodeno para la degradación de productos provenientes de la digestión. Este tipo celular presenta la particularidad de poseer un retículo endoplasmático muy desarrollado para la producción enzimática. Además de esto, se caracterizan por estar polarizadas, distinguiéndose un polo basolateral y un polo apical por el cual se produce la secreción de las enzimas sintetizadas en respuesta a distintos estímulos. En estado de ayuno el páncreas secreta el 20% de su almacenamiento máximo. En período pandrial y postpandrial las células acinares reciben diversos estímulos tanto nerviosos como hormonales o gástricos, que provocan un incremento de la secreción pancreática hasta sus valores máximos (Sánchez-Bernal C. et al, 2002).

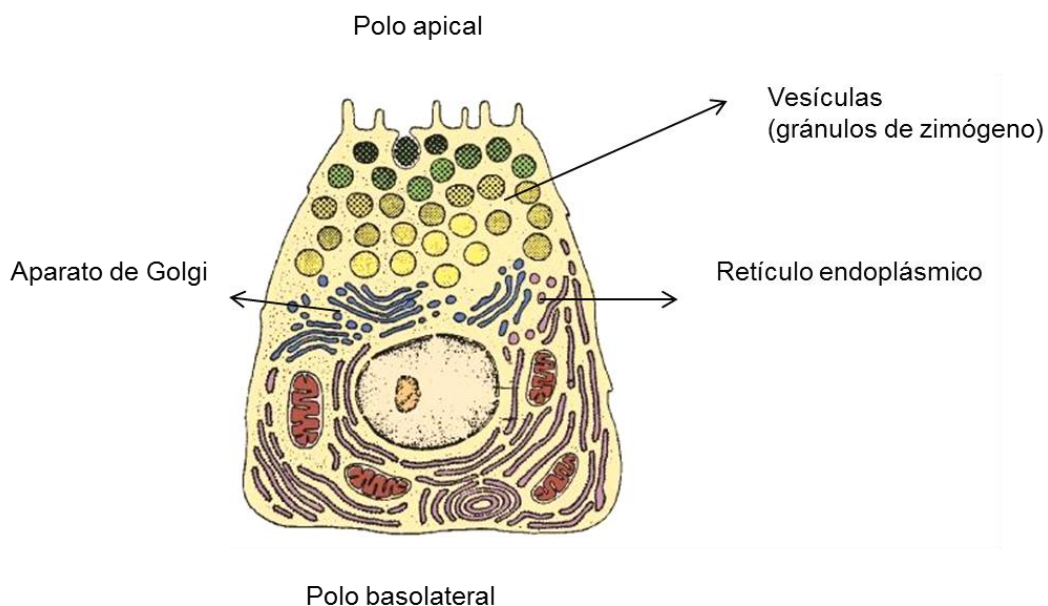


Fig. 4. Célula acinar pancreática

1.2.1. Mecanismos de síntesis y activación enzimática en la célula acinar

La principal característica del páncreas exocrino y por tanto, de la célula acinar pancreática es sintetizar y almacenar en vesículas las enzimas digestivas que desempeñan su función en el proceso de la digestión. Las enzimas pancreáticas se sintetizan en los ribosomas, pasan al retículo endoplasmático rugoso y de ahí al aparato de Golgi donde son almacenadas en compartimentos llamados **gránulos de zimógeno**.

Las enzimas sintetizadas en la célula acinar son principalmente la tripsina, quimiotripsina, elastasa, carboxipeptidasa, amilasa y lipasa. Dado que son proteasas con gran actividad de degradación en su forma funcional, estas enzimas se sintetizan en su forma inactiva, llamada **Zimógeno**, y son procesadas por proteólisis a su forma activa en respuesta a una señal fisiológica (Sánchez-Bernal C. et al, 2002).

1.2.1.1. Enzimas pancreáticas

- El **tripsinógeno**, precursor de la tripsina (fig. 5), se sintetiza en la célula acinar pancreática y se secreta a los conductos biliares por los cuales alcanza el intestino, donde es activado por proteólisis, mediante escisión de un octapéptido en el extremo N-terminal, por una enteroquinasa situada en la mucosa intestinal. Su forma activa, la tripsina, tiene un papel clave en la digestión, es la enzima que se va a activar en primer lugar y que va a desencadenar la cascada de activación del resto de enzimas pancreáticas. La tripsina es una enzima proteolítica que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas y grandes péptidos mediante hidrólisis, dando lugar a pequeños péptidos y aminoácidos. La tripsina tiene especificidad de sustrato, rompe

enlaces peptídicos en los que interviene el extremo carboxilo con residuos de lisina y arginina. Esta degradación es necesaria para que los péptidos de pequeño tamaño y los aminoácidos puedan ser absorbidos por la membrana intestinal.

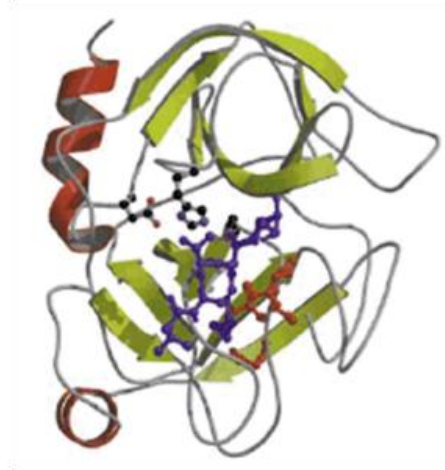


Fig. 5. *Conformación tridimensional de la tripsina*

A pesar de que casi el total del tripsinógeno de forma fisiológica se activa en el intestino, una pequeña proporción se activa antes de salir de la célula. Para evitar su actividad dentro del propio tejido pancreático, existen mecanismos de protección que inhiben la actividad de esta proteasa dentro de los acinos (fig. 6). La proteína SPINK1, serine protease inhibitor Kazal type 1, se une a un lugar específico al tripsinógeno e inhibe su proteólisis. Además, la propia tripsina activa tiene la capacidad de autodegradación por autólisis para reducir su actividad.

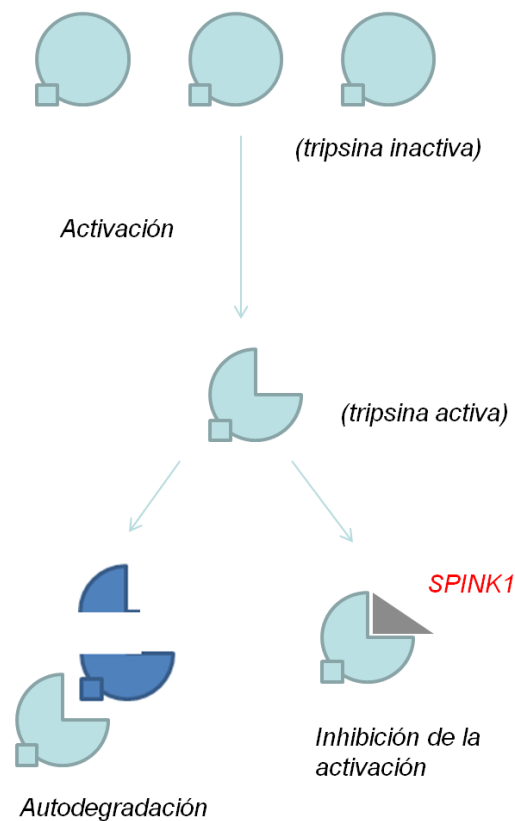


Fig. 6. Mecanismos de protección de la activación del tripsinógeno dentro de la célula acinar

- La **elastasa** es una endopeptidasa producida en las células acinares pancreáticas en forma de zimógeno precursor, la proelastasa, que es activada por la tripsina. La elastasa es una proteasa que hidroliza la elastasina, una proteína con funciones estructurales componente de las fibras elásticas conectivas. La elastasa actúa preferentemente sobre los enlaces peptídicos en los que interviene un aminoácido neutro portador de un radical alifático.
- EL **quimiotripsinógeno** es una enzima que también se activa por acción de la tripsina y se convierte en quimiotripsina (fig. 7). La quimiotripsina hidroliza en los extremos carboxiterminales con aminoácidos aromáticos, fundamentalmente los aminoácidos fenilalanina, triptófano, tirosina y metionina.

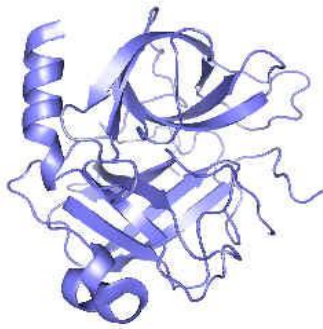


Fig. 7. Conformación tridimensional del quimiotripsinógeno

- La **carboxipeptidasa** también se sintetiza en su forma inactiva, pro-carboxipeptidasa, y es activada por la tripsina. Su mecanismo de acción es mediante el cofactor zinc y degrada extremos carboxiterminales, preferentemente grupos hidrofóbicos, liberando residuos de arginina y lisina.
- La **amilasa** (fig. 8) es la única enzima pancreática que hidroliza los enlaces 1-4 de la amilosa de las moléculas de glucógeno y almidón. El producto final mayoritario es el disacárido maltosa. A diferencia de las anteriores, la amilasa ya se sintetiza en su forma activa y se almacena en las vesículas hasta su secreción.

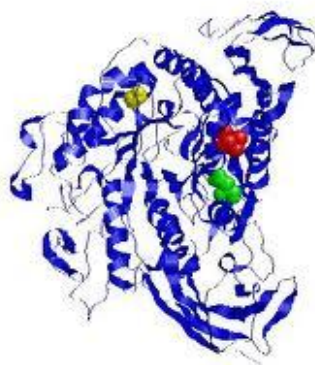


Fig. 8. Conformación tridimensional de la amilasa

- La **lipasa** (fig. 9) es una glicoproteína lipolítica que hidroliza los triglicéridos a glicerol y ácidos grasos, y posee el cofactor colipasa para poder ejercer su función. Al igual que la amilasa, se sintetiza en forma activa.

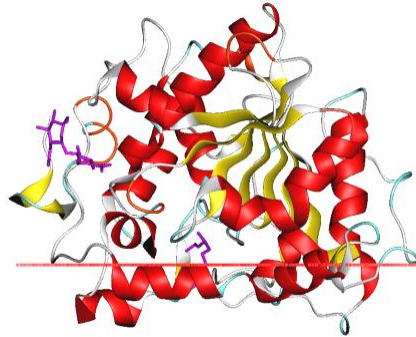


Fig. 9. Conformación tridimensional de la lipasa

- La **fosfolipasa A2** es una enzima lipolítica que se sintetiza como proenzima y es activada por la tripsina. Esta enzima hidroliza el enlace éster en posición 2 de los fosfoglicéridos y los convierte en fosfolípidos.

1.2.2. Mecanismos de secreción enzimática

Las células secretan proteínas sintetizadas en su RER mediante dos vías (fig. 10): la constitutiva, que está presente en todas las células y sirve para reponer las proteínas de membrana y la regulada, que solamente la poseen las células especializadas en secreción de vesículas, como son las células acinares pancreáticas (Alberts, 2010).

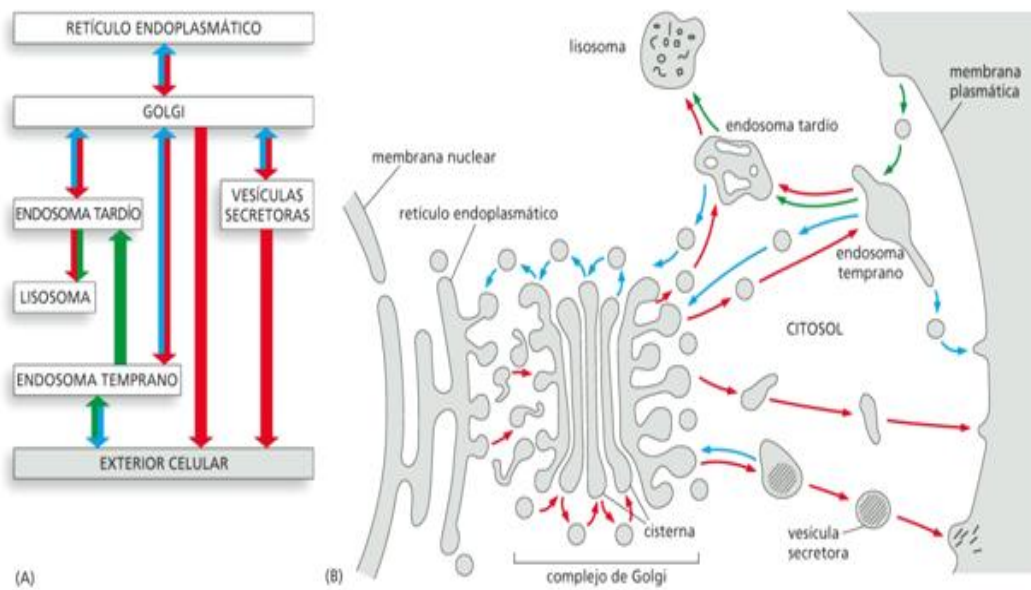


Fig. 10. Vías de secreción celular regulada y constitutiva (Alberts 2010)

El mecanismo de secreción de las enzimas pancreáticas consiste en una secuencia muy ordenada de acontecimientos en la cual las proteínas se sintetizan en el Retículo Endoplasmático Rugoso, maduran en el Aparato de Golgi y se almacenan en gránulos de zimógeno. En este proceso la célula acinar tiene que distribuir correctamente las proteínas sintetizadas que van a ser secretadas y las que no, mediante modificaciones post-traduccionales en el RER o la no-fosforilación de las enzimas secretoras, para diferenciarlas de las lisosómicas en el aparato de Golgi, y finalmente permitir la condensación de las vacuolas digestivas.

La señalización se complica más aun por tratarse de células polarizadas que envían las vesículas a zonas específicas de la membrana, donde se almacenan hasta recibir la señal apropiada para fusionarse con la membrana y secretarse al exterior celular (Belan et al., 1996). Para la exocitosis de los gránulos zimógenos en las células acinares es necesario que exista un incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ (Ito et al., 2007; Campos-Toimil et al., 2002).

Además, las células acinares tienen que regular su secreción en el momento adecuado del ciclo digestivo. Esta regulación se lleva a cabo en gran parte por la acción de distintas hormonas como la colecistoquinina (CCK), la insulina o los glucocorticoides, que estimulan la secreción pancreática, pero no siempre producen la misma respuesta desde el punto de vista cuantitativo.

Las células acinares pancreáticas responden a estímulos tanto nerviosos como hormonales regulando la secreción. Con respecto a los estímulos nerviosos, la señal vagal y los estímulos colinérgicos activan la secreción enzimática en células acinares de forma extrínseca; las neuronas colinérgicas y adrenérgicas intrapancreáticas secretan neuropéptidos que pueden estimular o inhibir la secreción. En relación a los estímulos hormonales, la CCK, que se libera en respuesta a productos derivados de las grasas y de las proteínas, es el principal mediador de la activación de la secreción enzimática en la fase intestinal del proceso digestivo actuando sobre células acinares pancreáticas.

Existen dos rutas de señalización intracelular en el proceso de secreción enzimática, una dependiente del calcio intracelular y la otra dependiente del AMPc. En concreto la CCK actúa a través de la señal de calcio, proceso que no está hoy en día suficientemente caracterizado y que se detalla en el siguiente apartado.

1.2.3. Homeostasis del calcio

El Ca^{2+} es un ión que funciona como segundo mensajero universal. Participa en la contracción celular, secreción, apoptosis y muchos más procesos vitales en la fisiología celular. Por ello, las células necesitan una sensibilidad adecuada a sus variaciones y un control de su concentración citoplasmática ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) para iniciar o parar la señalización mediada por el ión (Clapham, 2007). Para que funcione la señalización del Ca^{2+} en la

célula se necesita una $[Ca^{2+}]_c$ baja en condiciones basales, un mecanismo de amplificación de la señal y un mecanismo de terminación de la misma.

Existe un fuerte gradiente de Ca^{2+} hacia el citosol, ya que su concentración intracelular es mucho más baja que su concentración extracelular. Por ello cuando se abren canales que permiten su paso, el Ca^{2+} tiende a entrar en la célula. Para mantener este gradiente, la célula utiliza una bomba dependiente de ATP. (Petersen et al. 2005).

En las células acinares pancreáticas, la CCK se une a un GPCR, lo que da lugar a la activación de la fosfolipasa C ($PLC\beta$), con la subsiguiente transformación del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) en dos moléculas, el IP_3 y el DAG (Kanno T., 1998). El DAG participa en la síntesis de eicosanoides, que está relacionada principalmente con la comunicación intercelular. El IP_3 se une a un receptor específico en el ER, cuya activación produce la liberación de Ca^{2+} almacenado en dicha organela hacia el citosol. El Ca^{2+} se une a diversas proteínas celulares activándolas (fig. 11). Algunas de ellas median la fusión de vesículas a la membrana, con lo que se produce la secreción de las enzimas pancreáticas.

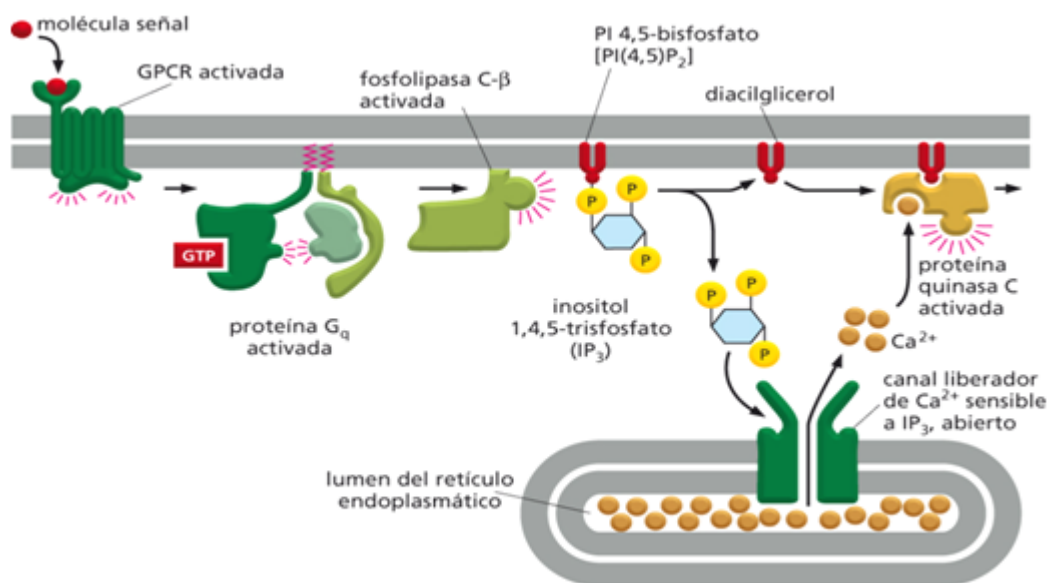


Fig. 11. Activación de incremento intracelular de calcio (*Biología molecular de la célula*, Ediciones Omega 2010)

1.2.4. Expresión y secreción de moléculas implicadas en el proceso inflamatorio

Las células acinares pancreáticas, además de su principal función de sintetizar, almacenar y secretar enzimas pancreáticas, pueden adquirir cierto carácter de célula inflamatoria en determinadas situaciones patológicas. En esta faceta, las células acinares activan mecanismos de señalización intracelulares mediante los cuales se van a producir la síntesis y secreción de una pequeña batería de citokinas que van a activar y reclutar células inflamatorias al parénquima pancreático (Dios ID., 2010).

1.2.4.1. Síntesis de moléculas inflamatorias

La proteína NFkappaB es un factor de transcripción que actúa como mediador intracelular y que interviene en diversos procesos celulares como respuesta inmune, estrés celular o fenómenos de supervivencia (Li X. et al, 2002). NFkappaB en su forma inactiva se encuentra en el citoplasma celular y es activado tempranamente en el inicio de un proceso inflamatorio. NFkappaB es un tetrámero que se activa por proteólisis mediante diversas vías de señalización. Una vez activado, una de las subunidades se dirige al proteosoma citoplasmático para ser degradada y la otra subunidad entra en el núcleo para actuar como factor de transcripción promotor de la expresión de moléculas inflamatorias (fig. 12). El proceso detallado consiste en que mediante señalización intracelular la subunidad Ikb se fosforila, lo cual constituye una señal para entrar en el proteosoma, y las subunidades p52 y p65 se separan de ésta y entran en el núcleo para actuar como factores de transcripción (Tak PP, Firestein GS., 2001). Numerosos estudios han propuesto que este factor de transcripción es clave dentro de la célula acinar para la producción de moléculas inflamatorias (Gukovsky I et al, 1998).

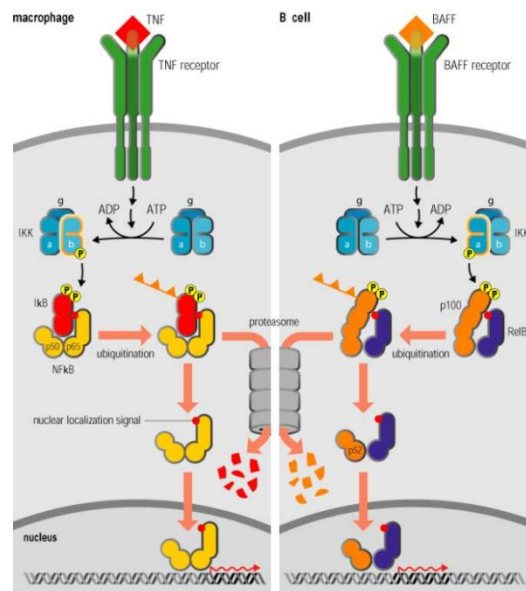


Fig. 12. Factor de transcripción NFkappaB y su activación mediante señalización celular.
(http://www.stat.rice.edu/~siefert/Research/NfKappaB_files/nsp-nfkb-2.jpg)

1.2.4.2. Citokinas proinflamatorias de la célula acinar

Como se ha mencionado al comienzo de esta sección, las células acinares pancreáticas tienen la propiedad de sintetizar y secretar moléculas inflamatorias. Se ha descrito que la célula acinar secreta principalmente TNF- α , Interleukina 6 (Il-6) e Interleukina 1 beta (Il 1beta). TNF- α es un mediador de respuesta inflamatoria aguda liberado durante diversas etapas de la patogenia (Gukovskaya AS. Et al, 1997). La Il-6 es una citokina proinflamatoria secretada fundamentalmente por los macrófagos, y en pequeñas cantidades por las células acinares pancreáticas (Lee J. et al, 2007), que se genera en la fase aguda de la inflamación. Il 1 beta es una citokina proinflamatoria expresada primariamente en monocitos sanguíneos, macrófagos tisulares y células dendríticas. Il 1 beta participa en la respuesta inflamatoria del sistema inmune liberada por células en las cuales se produce la activación de la cascada de activación de NFkappaB y JNK. Esta interleukina juega un papel muy activo durante la inflamación (Dios ID., 2010).

1.3. PANCREATITIS CRÓNICA

1.3.1. Definición y características clínicas

La pancreatitis crónica se caracteriza por un infiltrado inflamatorio crónico, fibrosis parenquimatosa y destrucción de células acinares e islotes de Langerhans. La destrucción del tejido se produce por la autodigestión del mismo a consecuencia de la activación de las enzimas pancreáticas digestivas dentro de las propias células acinares, lo cual puede conllevar a la destrucción total del parénquima pancreático.

Clínicamente esta patología se caracteriza por dolor abdominal y, en estadios avanzados, insuficiencia pancreática exocrina y endocrina (Diabetes mellitus secundaria a la pancreatitis crónica). La pancreatitis crónica es una enfermedad de elevada morbilidad. La edad media de diagnóstico se sitúa en 37 ± 9 años y la práctica totalidad de los pacientes presentan complicaciones durante su evolución, estimándose que el 50 % fallecen entre 12 y 20 años desde el diagnóstico (Lankisch PG, 2001). Algunas de las complicaciones que se producen son la presencia de calcificaciones, estenosis biliar, pseudoquistes, necrosis o cáncer de páncreas. Todos estos hechos confieren a la pancreatitis crónica una elevada relevancia clínica. Los datos de prevalencia de esta entidad son poco conocidos, ya que se trata de una enfermedad claramente infradiagnosticada. El diagnóstico se realiza en estadios avanzados, debido a que una elevada cantidad de veces la pancreatitis crónica cursa de forma asintomática y se manifiesta en etapas tardías. Hasta hace relativamente poco, se consideraban la pancreatitis aguda y la pancreatitis crónica como dos entidades distintas, sin embargo en los últimos tiempos se ha comprobado que la pancreatitis crónica puede surgir de varios episodios agudos de inflamación pancreática, dando lugar así a una inflamación crónica del páncreas (Stevens T. et al, 2004).

A día de hoy, la causa y el mecanismo celular mediante el cual se desencadenan los eventos asociados a esta patología, como la activación de las proteasas dentro del propio páncreas, la producción de especies reactivas del oxígeno o la producción de moléculas inflamatorias, aún no están claramente definidos.

En el área sanitaria del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, en nuestra Unidad Monográfica de Páncreas tenemos diagnosticados 430 pacientes con pancreatitis crónica, lo que refleja una prevalencia de 77.5 pacientes por 100.000 habitantes, de los cuales el 25 % desarrollan insuficiencia pancreática exocrina y el 20% diabetes secundaria a la pancreatitis crónica. Estos datos reflejan la necesidad de un mejor plan de prevención, basándose en el mejor conocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad.

1.3.2. Etiología de la Pancreatitis Crónica

En la actualidad la pancreatitis crónica se conoce como una enfermedad multifactorial en la que habitualmente dos o más factores etiológicos interactúan a través de distintas vías patogénicas para producir un único cuadro histopatológico y clínico. Este nuevo concepto es la base de la actual clasificación TIGAR – O (tabla 1) de la pancreatitis crónica (Etemad et al, 2001), en la que se define como el resultado de la interacción de factores tóxico-ambientales, inmunológicos, inflamatorios, obstructivos, metabólicos y genéticos, detallados a continuación.

Tóxico-metabólicas	Idiopática	Genética
Alcohol	Diagnóstico temprano	Hereditaria (mut. PRSS1)
Tabaco	Diagnóstico tardío	Mutaciones SPINK1
Hipercalcemia	Tropical	Mutaciones CFTR1
Hiperlipidemia		
Insuficiencia renal crónica		
Medicaciones		

Autoinmune	Pancreatitis aguda Recurrente	Obstructiva
PC autoinmune aislada	Postnecrótica	Páncreas divisum
Síndrome autoinmune (asociado a otras enfermedades)	Pancreatitis aguda Recurrente	Desorden Esfinter de Oddi
	Enfermedad vascular	Obstrucción ductal
	Post-irradiación	Post-traumático

Tabla 1. Factores etiológicos de riesgo asociados a pancreatitis crónica. Clasificación TIGAR-O

T, Tóxicos-metabólicos: Los factores tóxicos que están asociados a la pancreatitis crónica son el alcohol, el tabaco, hipercalcemia, hiperpatatiroidismo, hiperlipidemia, insuficiencia renal crónica y fármacos.

Dentro de este grupo se encuentra la causa más frecuente de pancreatitis crónica, el alcohol. El alcohol se relaciona con el 70-80% de los casos de pancreatitis crónica, de forma predominante en los países desarrollados (Szabo et al, 2007). La aparición de la enfermedad se relaciona con un consumo superior a 80 gramos o más de etanol al día, durante un período de tiempo que suele ser superior a los 10 años. Estos datos explican el pico de incidencia de la enfermedad, que se sitúa en torno a los 35-45 años (Schender&Montalvo, 1998; Singer MV, 2002; Strate T. et al, 2002; Yadav & Whitcomb, 2010). Se estima que el riesgo relativo de padecer una pancreatitis crónica aumenta en proporción directa con la cantidad de alcohol ingerido. Sin embargo, sólo aproximadamente el 10% de los alcohólicos terminan desarrollando la enfermedad, y es infrecuente su aparición en bebedores moderados. Todos estos datos apoyan el

hecho de que el alcohol precisa de otra serie de factores genéticos y/o ambientales para causar pancreatitis crónica.

En la actualidad, el tabaco también se considera como un factor importante en el desarrollo de la enfermedad. Recientemente, distintos estudios epidemiológicos preliminares han sugerido un papel relevante del tabaco como factor tóxico-ambiental de riesgo en el desarrollo de pancreatitis crónica (Yadav D et al, 2009; Lin Y et al, 2000; Tolstrup JS et al, 2009; Law R et al, 2010). En estos estudios, el riesgo de desarrollar pancreatitis crónica se asocia a la ingestión de alcohol y tabaco, pero estos dos factores son independientes (Lindkvist B et al, 2008).

I, Idiopática: En este grupo se incluyen aquellos casos en los que no se puede identificar ningún factor que pueda relacionarse con el desarrollo de la enfermedad. A medida que se conocen más factores etiológicos, el número de pacientes que se incluyen en este grupo disminuye de forma considerable. En concreto estos pacientes presentan unas características que permiten diferenciarlos de la pancreatitis crónica alcohólica: Por un lado, la presencia de un infiltrado inflamatorio con predominio de linfocitos T alrededor de los ductos interlobares, que origina una obstrucción y de forma ocasional una destrucción de los ductos, con la atrofia y fibrosis acinar correspondiente. Por otro, presenta una distribución bimodal; la forma juvenil, que se inicia entre los 10 y los 20 años, en donde predomina el dolor, y la forma adulta, de inicio entre los 50 y 70 años, donde predomina la insuficiencia pancreática, y donde el 50% de los pacientes no presentan dolor abdominal.

Dentro de esta etiología se encuentra la pancreatitis crónica tropical, que es una entidad más frecuente en algunas zonas de África y Asia. Afecta de forma predominante a niños y adultos jóvenes. La enfermedad se presenta de forma florida, con insuficiencia exocrina y endocrina. Las hipótesis asociadas a alteraciones dietéticas están hoy en día prácticamente abandonadas, sugiriéndose un probable factor genético de base (Witt H. et al, 2008).

G, Genética: En el año 1996 se descubrió una mutación en el gen del tripsinógeno catiónico (PRSS1) que causaba pancreatitis crónica, lo cual estableció una base genética subyacente a la enfermedad (Whitcomb DC. et al, 1996). Por otra parte, mutaciones frecuentes del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) y del inhibidor de la serin proteasa (SPINK1) también se asocian a la pancreatitis crónica. Las mutaciones más frecuentemente descritas en la pancreatitis crónica son las relacionadas con el PRSS1, de transmisión autosómica dominante y las mutaciones del CFTR y el SPINK1, de carácter autosómico recesivo.

Mutaciones del tripsinógeno catiónico: Las mutaciones del gen del tripsinógeno catiónico provocan la activación prematura del tripsinógeno en el páncreas, proceso asociado a lo que se denomina pancreatitis crónica hereditaria. Las mutaciones de los codones 29 y 122 originan formas autosómico dominantes de pancreatitis crónica. Las formas más frecuentes son la R122H y la N29I (Masson E et al, 2008). Otras menos frecuentes son las mutaciones de los codones 16, 22 y 23, originando el A16V, D22G y el K23R.

Mutaciones del CFTR: La fibrosis quística es una enfermedad autosómica recesiva por mutaciones en el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). La mutación en ambos alelos origina la forma florida de la enfermedad, con alteraciones en la concentración de cloro en sudor, hipertripsinogenemia neonatal, formación de pseudoquistes pancreáticos y fibrosis, con clínica de pancreatitis crónica y enfermedad pulmonar progresiva. La mutación más frecuente es una delección del codón 508 ($\Delta 508$), aunque se han descrito cerca de 900 mutaciones diferentes relacionadas con la enfermedad. Mutaciones del CFTR se han descrito frecuentemente en pacientes con pancreatitis crónica, sin datos de fibrosis quística.

Mutaciones del SPINK1: El inhibidor de la secreción pancreática de serin-proteasas es una proteína que inhibe específicamente la tripsina bloqueando su lugar de acción. El SPINK1 se sintetiza en las células acinares pancreáticas junto con el tripsinógeno. Se trata de la primera línea de defensa ante la activación prematura del tripsinógeno en las células acinares. Algunas de las mutaciones descritas en el gen que codifica para

estas proteínas son la N34S y la P55S, relativamente comunes en pacientes con pancreatitis crónica inicialmente etiquetados de pancreatitis idiopática, aunque no parecen suficientes para producir por sí solas una pancreatitis crónica pero sí para actuar como cofactores de la enfermedad.

A, Autoinmune: La pancreatitis crónica autoinmune es un fenómeno con unas características histológicas, morfológicas y clínicas propias, que puede presentarse tanto de forma aislada como en asociación con otra enfermedad de origen autoinmune (Síndrome de Sjögren, Cirrosis Biliar Primaria, Colangitis Esclerosante Primaria, Enfermedad de Crohn, Colitis ulcerosa). Histológicamente se caracteriza por destrucción de los ductos y fibrosis atrófica del tejido acinar sin calcificaciones. En los estudios de imagen el páncreas aparece agrandado con poca captación de contraste, incluso rodeado de una pseudocápsula, hipointensidad T1 en la RM o alteraciones difusas con estrechamientos del conducto de Wirsung con una pared irregular. Se han objetivado múltiples autoanticuerpos relacionados. Su diagnóstico precoz es esencial para la buena respuesta al tratamiento corticoideo (Sah RP. & Chari ST., 2012).

R, Pancreatitis aguda grave y recurrente: Postnecrosis (pancreatitis aguda grave) o pancreatitis aguda recurrente. La asociación de pancreatitis aguda recurrente con la pancreatitis crónica siempre ha sido objeto de discusión. Sin embargo, múltiples estudios han demostrado que la recuperación tras un episodio de pancreatitis aguda no siempre es completa, del mismo modo que hay una serie de entidades que inicialmente se presentan como pancreatitis aguda como paso previo al desarrollo de una pancreatitis crónica (Witt H. et al, 2007), como la pancreatitis alcohólica y la pancreatitis aguda hereditaria.

O, Obstructiva: las principales causas de la pancreatitis crónica obstructiva son el páncreas divisum, disfunción del esfínter de Oddi (controvertido), obstrucción ductal

(tumores y litiasis biliar), quistes periampulares de la pared duodenal y estructuras ductales post-traumáticas.

En lo que concierne a nuestra cohorte de pacientes, el 61.4 % padecen pancreatitis crónica alcohólica; el 22.8%, idiopática; el 4.1%, genética; el 1.8%, autoinmune; el 4.1% pancreatitis crónica derivada de pancreatitis aguda recurrente y el 5.8% etiología obstructiva. El gran porcentaje de pacientes con pancreatitis crónica de etiología idiopática, es decir, desconocida, nos hace pensar que existen factores de riesgo, que todavía no están bien identificados como causantes de la patología (como es el caso del tabaco) que podrían estar implicados en el desarrollo de la enfermedad.

1.4. FISIOPATOGENIA DE LA PANCREATITIS CRÓNICA EN LA CÉLULA ACINAR

En la célula acinar ocurren los principales eventos tempranos que conducen a la patogenia de la pancreatitis crónica, lo que posteriormente dará lugar a la progresión de la misma (Domínguez Muñoz JE., 2005; Gorelick FS. et al, 2009). Las alteraciones fisiopatogénicas (fig. 13) tempranas más importantes dentro de la célula acinar asociadas a la pancreatitis crónica son principalmente:

1. La activación prematura de los zimógenos en su forma activa dentro de la propia célula acinar.
2. La alteración en los niveles intracelulares de calcio.
3. La alteración de la secreción de las enzimas pancreáticas.
4. El desarrollo del proceso inflamatorio debido a la producción de moléculas proinflamatorias como citokinas.
5. Estrés celular
6. Fenómenos de muerte celular: necrosis y apoptosis.

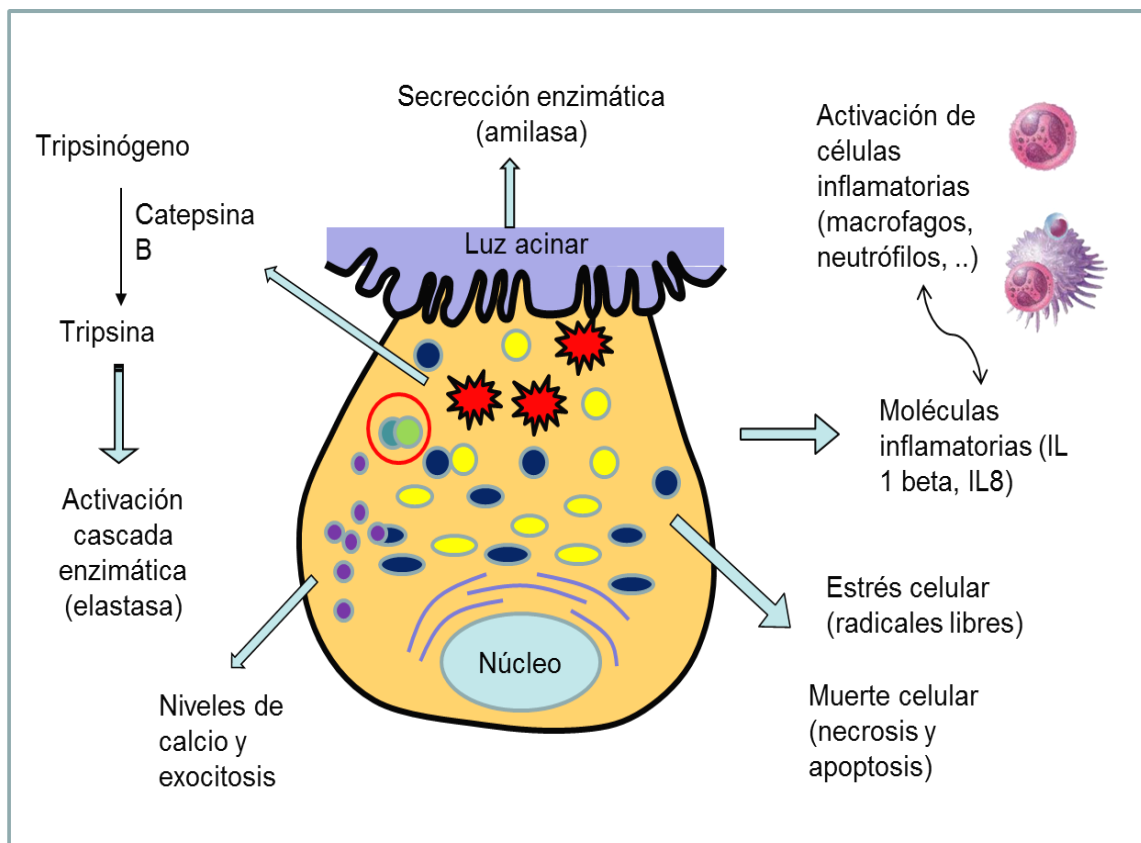


Fig. 13. Fisiopatogenia en la célula acinar asociada a la pancreatitis crónica

1.4.1. Activación enzimática intracelular prematura

Las células acinares producen una gran cantidad de enzimas pancreáticas, las cuales, para prevenir la autodigestión se sintetizan en su forma inactiva. En condiciones fisiológicas, una pequeña cantidad de zimógenos se activan dentro de la propia célula acinar, pero existen mecanismos de protección tales como cambios de pH, proteínas inhibidoras de la activación (SPINK-1) y proteasas (la propia tripsina) que degradan las enzimas activas evitando el daño celular (apartado 1.2).

En la patogenia de la Pancreatitis Crónica, la activación de enzimas pancreáticas dentro de las células acinares constituye un mecanismo inicial clave desencadenante

del resto de eventos que precede al desarrollo de pancreatitis crónica (Lüthen R et al, 1998), asociándose a procesos de necrosis celular (Ji B. et al, 2009) y liberación de citokinas proinflamatorias por parte de la propia célula, lo que conlleva al desencadenamiento del proceso inflamatorio (Tando Y, 2005; Jiang C, 2008). Este hecho puede ser debido a que la propia tripsina exógena activa el proceso inflamatorio en las células vecinas (Maeda K. et al, 2005). Otra teoría es que estos dos sucesos, tanto la activación prematura como el desarrollo del proceso inflamatorio, suceden a la vez en la pancreatitis crónica experimental, pero de forma independiente (Hietaranta AJ, 2001; Han B, 2001), no asociándose la activación del tripsinógeno con la activación de NFkappaB ni con la expresión de citokinas (Van Acker GJ. Et al, 2007).

La activación de las enzimas pancreáticas se inicia con la activación de tripsinógeno a tripsina, la cual producirá la activación de la cascada del resto de proteasas digestivas (fig. 14). Por tanto, una activación prematura de la tripsina activará la cascada enzimática dentro de la propia célula acinar lo que se traducirá en autodigestión del tejido pancreático (Closa Auet, D. 2002).

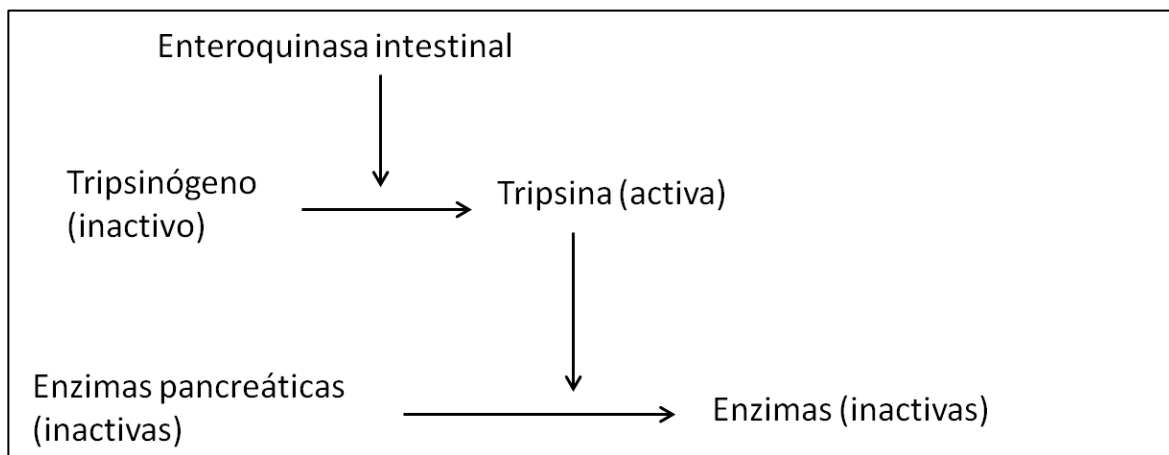


Fig. 14. Cascada de activación enzimática

Hoy en día, los factores extracelulares y el mecanismo de señalización intracelular por el cual se produce la activación de la tripsina no están claramente establecidos. En

estudios *in vitro* en células acinares pancreáticas, la estimulación supramáxima de CCK resulta en activación de zimógenos y necrosis celular (Saluja AK et al, 1999; Grady T. et al, 1998, Halangk W et al, 1997). En estudios *in vivo*, la tripsina activa es detectada en ratas 10 minutos después de su estimulación con caerulina y esta activación se asocia a la producción de edema, vacuolización y alteración de la secreción, lo que corrobora el papel de la activación prematura enzimática como evento iniciador de la pancreatitis crónica (Grady T. et al, 1996). Sin embargo, la propia tripsina no autoactiva más tripsinógeno (Halangk W et al, 2002). La activación prematura del tripsinógeno está mediada por Rho-kinasa, un regulador específico de actividad proinflamatoria (Awla D. et al, 2011).

Una de las teorías más consolidadas para explicar la activación prematura de enzimas pancreáticas es la colocalización de vesículas y lisosomas. Se ha demostrado que la catepsina B, enzima que se encuentra en el compartimento lisosomal, activa al tripsinógeno (Van Acker GJ et al, 2002; Hofbauer B et al, 1998; Saluja AK et al, 1997). Sin embargo, hay estudios que proponen que la activación del tripsinógeno dentro de la célula acinar es independiente de la actividad de la catepsina B (Klonowski-Stumpe H et al, 1998)

Se ha propuesto también que las moléculas o células proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF α) o los neutrófilos, son capaces de activar la tripsina dentro de la célula acinar. El factor de necrosis tumoral induce la activación prematura enzimática (Sandler et al, 2012) y la depleción de neutrófilos atenúa la activación del tripsinógeno (Gukovskaya et al, 2002). Esto implicaría la existencia de un mecanismo de feedback positivo entre los eventos patogénicos que dan lugar a la pancreatitis crónica.

En los últimos años también se han estudiado moléculas (piperine, nafamostat) que tienen una función inhibitoria de la activación prematura de la tripsina y se asocian con la atenuación o bloqueo de los eventos asociados a la enfermedad, por lo que se proponen como futuros agentes terapéuticos (Hashimoto D et al, 2009; Bae GS et al, 2011) .

1.4.2. Papel del calcio en la fisiopatología de la pancreatitis crónica

Como ya se ha mencionado con anterioridad, el calcio intracelular interviene en numerosos eventos fisiológicos en la célula acinar, por tanto es razonable que también esté implicado en alteraciones patológicas asociadas a dichos procesos.

En pancreatitis inducida en animales de experimentación se ha descrito elevaciones anormales de la $[Ca^{2+}]_c$ dentro de la célula acinar (Ward JB et al, 1996; Ward JB et al, 1995). Concentraciones supramáximas de CCK incrementan los niveles de calcio intracelular en la célula acinar (Okada N. et al, 1998). Por tanto, variaciones en los niveles de calcio intracelular juegan un papel crítico en los eventos celulares tempranos que preceden el desarrollo de pancreatitis crónica. (Mooren FCh et al, 2003). En la liberación anormal de calcio al espacio citoplasmático pueden participar, además del retículo endoplásmico, los compartimentos ácidos que se encuentran en la zona apical (Petersen OH et al, 2011).

Diversos estudios parecen indicar que la prematura activación tanto de la tripsina como del resto de los enzimas digestivos en el interior de las células acinares podría estar causada por una alteración de los niveles normales de $[Ca^{2+}]_c$ (Krüger B. et al, 2000; Sutton R. et al, 2008; Shah AU et al, 2009) inducida por la calcineurina (Husain SZ et al, 2007; Muili KA et al, 2012). Además, la distribución espacial y temporal de calcio intracelular en respuesta a estímulos fisiológicos o patológicos ha sido relacionada directamente con activación prematura de enzimas digestivas en el páncreas, conduciendo a daño pancreático (Ward et al, 1996; Hofbauer B. et al, 1998). Así, un incremento de calcio en el citoplasma está implicado en fenómenos de muerte celular (Gukovskaya AS & Gukovsky I., 2011), tanto en procesos de necrosis (Petersen OH et al, 2006) como de apoptosis (Yu JH. et al, 2003). Dependiendo del estímulo al que sea sometida la célula acinar, se producen distintos patrones de elevación de calcio dentro

de la célula que pueden conllevar a fenómenos de necrosis o de apoptosis (Criddle DN et al, 2007).

1.4.3. Alteración de la secreción enzimática

Después de su procesamiento en el Aparato de Golgi, las proteínas pancreáticas son almacenadas en vacuolas denominadas Gránulos de Zimógeno. En la patogenia de la pancreatitis experimental se ha demostrado el incremento en el contenido enzimático dentro de dichos gránulos (Manso M.A. et al, 1999). Respecto a la secreción, un incremento en los niveles intracelulares de calcio desencadena la fusión de los gránulos de zimógeno con la membrana apical de la célula acinar y desencadena la secreción enzimática (fig. 15). Por tanto se establece que la secreción enzimática depende de los niveles de calcio (Low JT et al, 2010), siguiendo un patrón espacio-temporal que es crítico para una secreción efectiva (Willems PH et al, 1993).

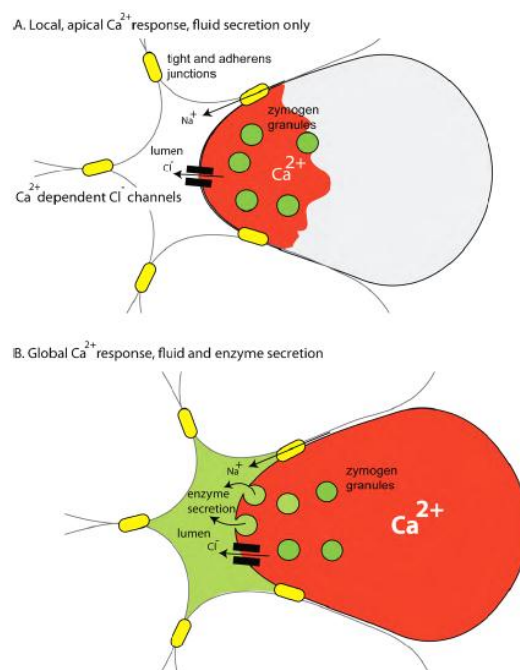


Fig. 15. Papel del incremento del calcio en la secreción enzimática (Low JT et al, 2010)

En el proceso de la pancreatitis crónica experimental, diversas perturbaciones se han visto implicadas en la alteración de la secreción. Modificaciones en las proteínas de membrana de los gránulos de zimógeno, tales como glicoproteínas, mucina o sincolina (Williams JA., 2010); las proteínas SNARE, que intervienen en la fusión de los gránulos con la membrana (Cosen-Binker LI et al, 2008; Campos-Toimil M. et al, 2007); o la alteración en la reorganización de los filamentos de actina intervienen en la perturbación de la secreción enzimática (Rosado JA. et al, 2002; Campos-Toimil M. et al, 2002; Thomas P. et al, 2006)

Con respecto a los mecanismos intracelulares, además del calcio, segundos mensajeros como el AMPc, DAG o Proteinkinasa también están implicados en la secreción enzimática (Sancho V. et al, 2011).

El primer efecto fisiológico de la CCK y sus análogos en el páncreas es la estimulación de la secreción de proteínas. En la pancreatitis crónica experimental, dosis supramáximas de CCK estimulan una secreción suprafisiológica asociada a la enfermedad (Carter KJ et al, 1987).

1.4.4. Desarrollo del proceso inflamatorio

El principal rasgo de la pancreatitis crónica es el desencadenamiento de un proceso inflamatorio con secreción de interleukinas por parte de la célula acinar pancreática que promueven el reclutamiento de células inflamatorias para que se produzca el infiltrado inflamatorio en el parénquima pancreático. La respuesta inflamatoria dentro de la célula acinar es el proceso patológico central en el mecanismo de la pancreatitis (Bhatia et al, 2000; Norman 1998)

El primer evento inflamatorio que se produce dentro de la célula acinar es la activación de rutas de señalización y factores de transcripción que promueven la expresión de moléculas proinflamatorias. Entre ellos, el factor de transcripción NFKappaB es un mediador intracelular que activa la transcripción de dichas moléculas, como la Interleukina 1 beta (Pandol SJ et al, 2007) y su activación también se asocia a la activación de zimógenos y a fenómenos de necrosis celular (Gukovskaya et al, 2002; Sandoval et al, 1996). Además, existen trabajos que apoyan que la activación de zimógenos promueve la activación del factor de transcripción NFkappaB (Jiang C. et al, 2008) y hay otros, por el contrario, que afirman que se trata de dos procesos independientes (Ji B. et al, 2009). Un estudio muy reciente realizado en ratones transgénicos, demostró que la sobreexpresión de p65 se asocia a rasgos de pancreatitis crónica como pérdida de células acinares o un incremento de infiltrado inflamatorio (Huang H. et al, 2013).

En estudios *in vivo*, la sobreexpresión de IL1beta en páncreas de rata induce pancreatitis crónica (Marrache F. et al, 2008). Además, ratones que expresan IL1beta desarrollan pancreatitis crónica severa, caracterizada por infiltrado inflamatorio, atrofia pancreática y necrosis extensiva todo ello dependiente de la activación del tripsinógeno (Romic JM et al, 2012).

Dosis supramáximas de CCK en estudios *in vitro* e *in vivo* desencadena la activación de la cascada de las MAP-quinasas (mitogene-activated protein kinase) y conduce a la activación de protequinasas intracelulares proinflamatorias. Aproximadamente al mismo tiempo, se activan factores de transcripción proinflamatorios como el NFKappaB (Chan YC et al, 2011). Concretamente, la activación de NFKappaB está mediada por la activación de PK1 (Yuan J. et al, 2008). Por otra parte, concentraciones supramáximas de CCK estimulan la producción de TNF- α e interleukina 1 beta en células acinares pancreáticas (Binker MG. et al, 2010; Tamizhselvi R. et al, 2009)

1.4.5. Estrés celular: producción de especies reactivas del oxígeno

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son productos oxidativos del metabolismo que se generan durante la reducción del oxígeno a la molécula de agua. En este proceso, el oxígeno incorpora cuatro electrones de forma consecutiva, formándose ROS como moléculas intermedias. La mitocondria es la principal fuente de formación de ROS (Chance B. et al., 1979). En primer lugar se forma el anión superóxido que va a dar lugar al resto de las especies reactivas, causando el denominado Estrés Oxidativo (fig. 16). En el páncreas exocrino, en la célula acinar, las especies reactivas, tales como el peróxido de hidrógeno, se producen por la acción de la enzima xantina oxidasa.

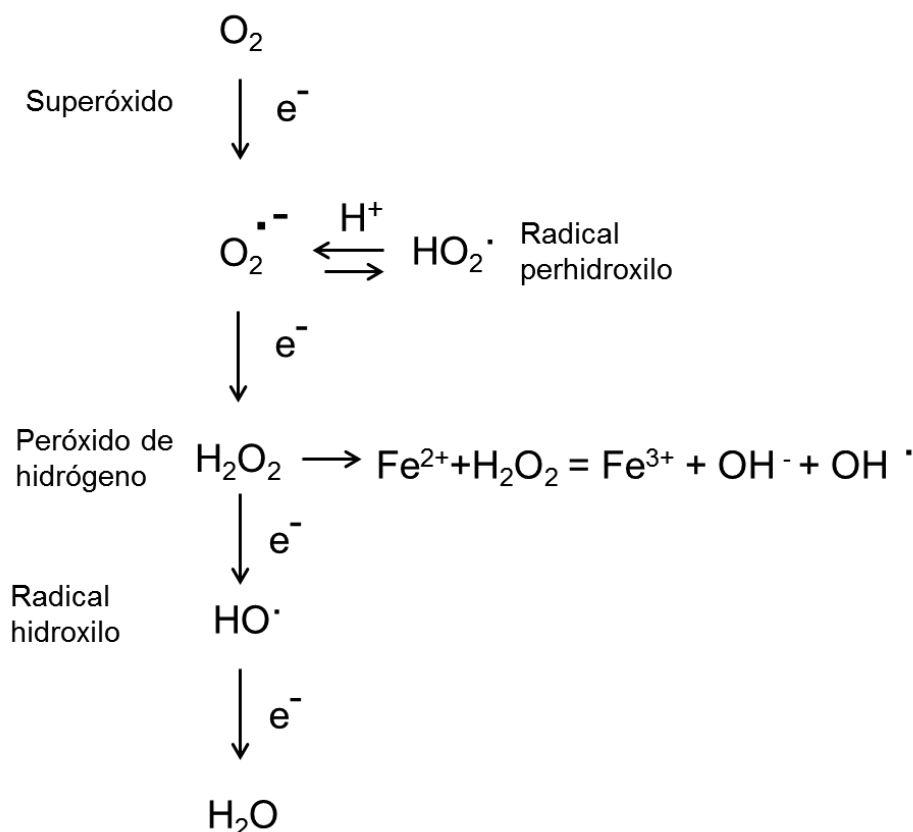


Fig. 16. Formación de especies reactivas del oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno son consideradas factores patogénicos que producen diversas alteraciones celulares, sin embargo el mecanismo por el cual esto producen este efecto no está claramente establecido. ROS, al poseer electrones libres, reacciona con un alto número de moléculas, oxidándolas y atacando sus estructuras, lo que conlleva la desestructuración y pérdida de funcionalidad de la célula. El estrés oxidativo se ha observado hasta la fecha asociado a múltiples patologías en otros órganos como el hígado o el corazón (Bosoi et al, 2012; Andre L et al, 2012).

El estrés oxidativo está implicado en el desarrollo de pancreatitis aguda en varios modelos animales de experimentación (Schoenberg MH. et al, 1994; Sanfey H et al, 1986). Además, las especies reactivas del oxígeno han sido implicadas en la patogénesis de la pancreatitis crónica. El daño pancreático causado por infusión de dosis supramáximas de caerulina produce la formación de especies reactivas del oxígeno (Suzuki H. et al, 1993) y a este fenómeno le sigue la liberación de enzimas digestivas (González A. et al, 2006). Por otra parte, se ha observado que en este tipo celular ROS produce alteraciones en los niveles de calcio intracelulares (Sweiry JH. et al, 1999). También se ha asociado la producción de ROS con fenómenos de muerte celular (Gukovskaya AS & Gukovsky I., 2011). Estos hallazgos sugieren que la producción de especies reactivas del oxígeno juega un papel mediador de la patogenia de la pancreatitis crónica.

Se ha demostrado que moléculas antioxidantes como cinnamtanina B-1 o sesamol (González A. et al, 2012; Chu PY et al, 2012) atenúan las alteraciones producidas en la pancreatitis experimental y en la rutina clínica se utiliza el tratamiento con antioxidantes en pacientes diagnosticados de pancreatitis crónica.

1.4.6. Muerte celular: necrosis y apoptosis

Los procesos de muerte celular se suceden de una manera secundaria a los eventos iniciales asociados a la pancreatitis crónica. Posterior a la activación prematura del tripsinógeno, se produce la activación del resto de las enzimas pancreáticas y, consecuentemente, autodigestión del parénquima pancreático por necrosis. Por tanto, en las células acinares pancreáticas los procesos de muerte celular pueden estar mediados por la activación prematura del tripsinógeno dentro de la propia célula (Saluja AK et al, 1999).

Se conocen dos tipos distintos de muerte celular: la necrosis y la apoptosis. Ambos tipos de muerte celular se observan en las células acinares pancreáticas (fig. 17) en modelos experimentales de pancreatitis (Gukovskaya & Pandol, 2004)

La apoptosis se caracteriza por la activación de la cascada de un tipo de serinproteasas, las caspasas, conduciendo a contracción celular y condensación nuclear. La caspasa 3 se utiliza como marcador temprano de la apoptosis. Las células se convierten en cuerpos apoptóticos que serán fagocitados. Por tanto, la apoptosis se asocia a una disfunción de la mitocondria, sin que se produzca liberación de moléculas intracelulares por lo que no se asocia a proceso inflamatorio.

Por otra parte, la necrosis se caracteriza por la alteración de órganos intracelulares desencadenando la ruptura de la membrana plasmática, por lo que se produce la liberación de numerosos mediadores al espacio extracelular que pueden dar lugar a la respuesta inflamatoria. Los factores que pueden contribuir a la necrosis son de naturaleza extrínseca tales como daños osmóticos, térmicos, tóxicos o traumáticos.

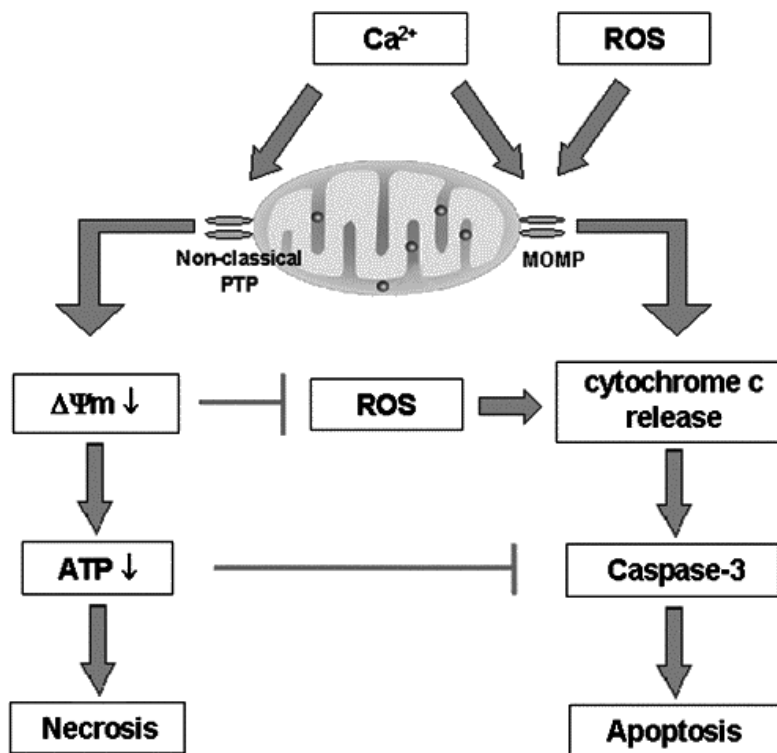


Fig. 17. (Gukovsky I et al, 2011). Necrosis y apoptosis en células acinares pancreáticas.

La severidad de la pancreatitis en animales de experimentación es directamente proporcional a la cantidad de necrosis e inversamente proporcional a la cantidad de apoptosis. Se ha demostrado que dosis supramáximas de CCK inducen la apoptosis en células acinares pancreáticas (Sata N. et al, 1999)

En 1895 Mouret señaló que una excesiva estimulación colinérgica se asocia con el desarrollo de daño pancreático determinado por vacuolización y necrosis de células acinares consecuencia de la activación prematura de enzimas pancreáticas (Mouret J., 1985). Además de esto, también las concentraciones elevadas de colicistokinina presentan capacidad de inducir activación de caspasas (Gukovskaya et al, 2002).

CCK como inductor de pancreatitis en modelos experimentales

Uno de los modelos mejor descritos y estudiados de pancreatitis experimental es el modelo inducido por colecistokinina (CCK). Dosis suprafisiológicas de CCK (10-100 veces más altas que las dosis fisiológicas) inducen pancreatitis tanto en estudio *in vivo* como *in vitro* (San Román JI. et al, 1990; Saluja AK. et al, 2007). El modelo experimental de pancreatitis inducida por secretagogo es ideal para los estudios que abordan los aspectos asociados a esta enfermedad, ya que este modelo comporta una forma altamente reproducible y fácilmente inducible de la patología. Este sistema *in vitro* es altamente ventajoso ya que por estimulación supramáxima con CCK se pueden reproducir diversos eventos patogénicos asociados a la pancreatitis (Han B. et al, 2001).

1.5. PAPEL DE LOS FACTORES TÓXICOS SOBRE LOS EVENTOS FISIOPATOGÉNICOS ASOCIADOS A LA PANCREATITIS CRÓNICA

Numerosos estudios epidemiológicos a lo largo de los años han establecido como el principal factor de riesgo para la pancreatitis crónica el consumo de alcohol, mientras que el consumo de tabaco sólo se consideraba factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de páncreas. En estudios recientes, sin embargo, se ha empezado a demostrar una clara asociación del consumo de tabaco con el desarrollo de pancreatitis crónica, factor de riesgo a su vez del cáncer de páncreas (Yadav D et al, 2009; Lin Y et al, 2000; Tolstrup JS et al, 2009; Law R et al, 2010).

A nivel molecular y celular existen varias alteraciones claves, mencionadas anteriormente, que se consideran los desencadenantes del inicio de la enfermedad, sin embargo no se sabe con certeza si dichas alteraciones están relacionadas, ni cuáles son los factores extrínsecos o intrínsecos que pueden provocarlas.

Un alto porcentaje de pancreatitis, alrededor del 70 %, son de origen etílico, de hecho hasta hace muy poco se consideraba como una patología característica de personas con hábito alcohólico. Está claramente establecido el alcohol como causa tóxico-ambiental principal para el desarrollo de la pancreatitis crónica produciendo alteración en la fisiología normal de las células pancreáticas (Tapia JA et al, 2010; Vonlaufen A et al, 2007; Szabo G et al, 2009), sin embargo en los últimos años el tabaco está adquiriendo gran relevancia como factor tóxico y dañino del tejido pancreático, pudiendo producir variaciones en la fisiología normal de las células.

1.5.1. Papel del alcohol en la Pancreatitis Crónica

Hoy en día el consumo de alcohol, junto con la obstrucción ductal, es la causa más frecuente para el desarrollo de pancreatitis, pero el alcohol por sí sólo no puede causar los mecanismos patogénicos de la enfermedad (Pandol et al, 2011). El alcohol en las células acinares pancreáticas se puede metabolizar por dos vías distintas (fig. 18), la oxidativa produciendo acetaldeído y la no-oxidativa produciendo ésteres de ácidos grasos. Se ha sugerido la implicación de polimorfismos en las enzimas que intervienen en el metabolismo del alcohol como responsables de los distintos efectos del alcohol en el páncreas (Wilson JS & Apte MV, 2003)

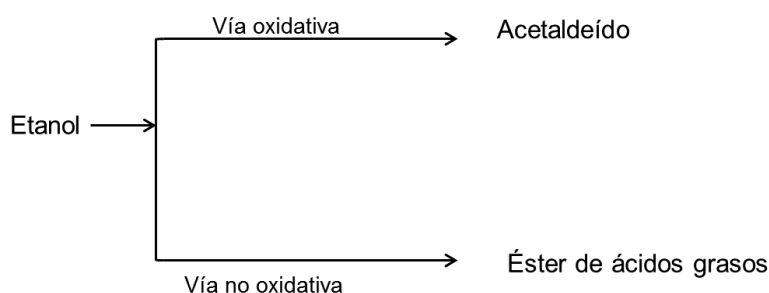


Fig. 18. Metabolización del alcohol en el páncreas

Se ha demostrado que en la pancreatitis alcohólica existe una alteración del proceso de exocitosis en las células acinares, constatándose un desplazamiento de dicho proceso hacia el polo basolateral de la célula, lo que contribuye a la progresión de la enfermedad (Lam PP et al, 2007). Por otra parte, también se ha descrito que el alcohol puede activar formas específicas de PKC implicadas en la secreción enzimática (Gorelick et al, 2008).

Se ha postulado que el etanol puede alterar la extrusión de Ca^{2+} del citoplasma hacia el espacio intracelular, contribuyendo de ese modo a mantener un nivel de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ anormalmente elevado, que sería precursor de un estado de pancreatitis

(González et al, 2008). Sin embargo, a pesar de la relación que existe entre el incremento de calcio intracelular y el aumento de secreción enzimática, de manera contradictoria se ha descrito que el alcohol bloquea la secreción de enzimas en la célula acinar (Dolai S. et al, 2012).

Por otra parte, se ha propuesto también que el alcohol produce la activación intracelular de proteasas pancreáticas mediado por la liberación de calcio (Gerasimenko JV. et al, 2009). Se ha visto que el alcohol está implicado en la colocalización con lisosomas en la activación enzimática intracelular inducida por CCK (Hirano T. et al, 1993).

Con respecto al proceso inflamatorio, el alcohol sensibiliza al páncreas a una respuesta inflamatoria a través de mecanismos que implican la activación de NFkappaB producida por señales neurohormonales (CCK) (Gukovskaya AS et al, 2004), pero se desconoce el efecto directo del alcohol sobre dicha activación, aunque se ha demostrado que sus metabolitos oxidativos incrementan la activación de factores de transcripción proinflamatorios (Gukovskaya AS. Et al, 2002).

En animales de experimentación, la ingesta de alcohol promueve el cambio en los fenómenos de muerte celular, se produce una disrupción en el balance de apoptosis a necrosis (Fortunato F et al, 2006; Gukovskaya AS et al, 2006) y una disminución de la regulación de la expresión de caspasas en el páncreas (Wang et al, 2006). Además de todo esto, el alcohol promueve la formación de piedras en los ductos pancreáticos provocando obstrucción ductal mediante la estimulación de depósito de la litostatina (Apte et al, 1996).

A lo largo de los años se ha estudiado en células acinares pancreáticas el papel del alcohol en la pancreatitis *in vitro* inducida por dosis supramáximas de CCK y se ha visto que este tóxico sensibiliza a la célula al efecto patogénico de la CCK (Pandol SJ et al, 2003). Sin embargo, más escasos son los estudios que demuestran el efecto directo del alcohol en células acinares al margen de su efecto sobre las alteraciones producidas por una hiperestimulación.

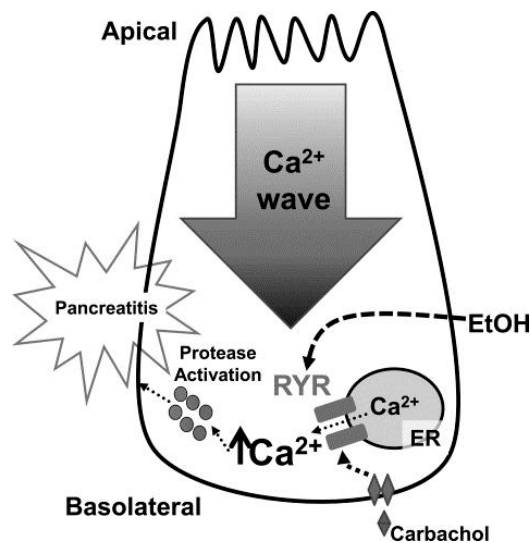


Fig. 19. Propuesta del mecanismo por el cual el alcohol desencadena eventos patológicos en la célula acinar pancreática. (Orabi Al et al, 2011)

1.5.2. Papel del tabaco en la Pancreatitis Crónica

El efecto perjudicial del tabaco sobre la salud humana está absolutamente comprobado. Las consecuencias conocidas incluyen bronquitis crónica, cáncer de pulmón, cardiopatías y otros trastornos de tejidos, órganos o sistemas del organismo. Está demostrado que el tabaco induce inflamación crónica en tejidos distintos del páncreas, como es el caso del pulmón. En éste, el proceso inflamatorio inducido por el tabaco se produce por activación de los macrófagos alveolares (Koch A et al, 2004), lo que sugiere que un mecanismo similar podría ocurrir en el páncreas. El tabaco induce infiltración de neutrófilos dentro de alveolos a través de la activación de NFκB (Vecchio D. et al, 2010). Sin embargo, la relación entre los constituyentes del humo del tabaco y las enfermedades que causan todavía no está plenamente dilucidada. Se ha observado también en las células de pulmón, que el tabaco produce un incremento de la

producción de las especies reactivas del oxígeno, por lo que también se podría sugerir un efecto similar del tabaco en células acinares pancreáticas.

Con respecto a los avances en la investigación sobre el efecto del tabaco en el páncreas, estudios epidemiológicos preliminares han sugerido la relevancia del tabaco como factor tóxico-ambiental de riesgo en el desarrollo de pancreatitis crónica. En numerosos de éstos, el riesgo de desarrollar pancreatitis crónica se asocia a la ingestión de alcohol y tabaco, pero estos dos factores son independientes. Por otra parte, estos estudios epidemiológicos proponen que el consumo de tabaco altera la función pancreática exocrina, estudiando los niveles de amilasa y lipasa en pacientes fumadores comparándolos con pacientes no fumadores (Milnerowicz H. et al, 2004; Sliwińska-Mossoń M. et al, 2005). Otros asocian el tabaco a un más temprano diagnóstico de la enfermedad y al riesgo de aparición de calcificaciones (Maisonneuve P et al, 2005).

En animales de experimentación, también se hicieron diversos estudios sobre el efecto del tabaco en el páncreas. La administración de tabaco, inhalado y bebido, permitió la observación de sus efectos tanto a nivel tisular como en sangre. Como resumen global de estos experimentos, se observó que la exposición prolongada al tabaco modifica los niveles de enzimas pancreáticas y su expresión (Lindkvist B. et al, 2008) y se asocia a un aumento estrés oxidativo (Jianyu-Hao et al, 2009), induce la formación de vacuolas intracitoplasmáticas, modifica los niveles de secreción de insulina, estimula la producción de moléculas inflamatorias y de moléculas que intervienen en procesos de fibrosis y favorece el desarrollo de calcificaciones (Wittel UA et al, 2006).

En cuanto a los estudios a nivel celular, hasta ahora sólo se conoce el efecto de la nicotina aislada. Se ha publicado que la nicotina del tabaco puede provocar vacualización citoplasmática, edema celular en páncreas exocrino, aumento de secreción enzimática y disminución de secreción de bicarbonato (Chowdhury P et al, 2002). Además, se ha descrito que la hormona CCK promueve la acumulación de nicotina en las células acinares pancreáticas (Doi R. et al, 1995). También se estudió el

efecto de la nicotina sobre la proliferación de células acinares y se observó que la exposición a la nicotina puede conducir a la disrupción del balance dinámico entre muerte y proliferación celular (Chowdhury et al, 2006).

El consumo de tabaco se ha sugerido como el factor de riesgo más importante asociado a enfermedades pancreáticas. Se ha demostrado que ratas expuestas a nicotina por vía oral o en forma de aerosol muestran cambios en la función e histología pancreática asociados al inicio de pancreatitis crónica (Chowdhury P et al, 2008). Además se ha demostrado mediante marcaje de nicotina (H^3) que ésta se acumula en gran cantidad en el páncreas (Chowdhury P et al, 1993).

A pesar de todo lo anteriormente descrito, no existen estudios que hayan determinado los efectos del extracto del tabaco o de alguno de sus componentes aislados sobre los eventos fisiopatogénicos asociados a la pancreatitis crónica en las células acinares pancreáticas.

En resumen, a pesar de los numerosos estudios epidemiológicos realizados en relación con la asociación del tabaco y la pancreatitis crónica y los estudios *in vivo* anteriormente citados, el mecanismo por el cual el tabaco induce la patología pancreática es desconocido. En vista de lo expuesto, resulta evidente que todavía quedan muchos interrogantes por resolver en cuanto a los efectos del tabaco o de sus componentes sobre las células acinares pancreáticas y su implicación en el inicio y la progresión de la pancreatitis crónica. Por tanto, en el presente trabajo de investigación traslacional, el estudio del conocimiento exacto del papel del tabaco en la fisiopatología de las células acinares pancreáticas asociada a pancreatitis crónica será clave para un óptimo manejo en la práctica clínica diaria de los pacientes con dicha patología.

2. HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

El tabaco, de manera independiente al alcohol, produce la alteración de la fisiología de las células acinares pancreáticas, desencadenando los procesos patogénicos iniciales asociados a la pancreatitis crónica. En concreto, el tabaco actúa sobre la activación y secreción inadecuada de sus enzimas, la alteración de los niveles de calcio, el desarrollo del proceso inflamatorio y la activación de procesos de estrés celular y muerte celular.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Objetivo principal

Evaluar el efecto del tabaco en comparación con el alcohol, sobre la fisiología de las células acinares pancreáticas *in vitro* y en la inducción de los cambios patogénicos ocurridos en dichas células asociados al desarrollo de pancreatitis.

Objetivos secundarios

1. Optimizar el aislamiento de células acinares pancreáticas para su empleo en estudios *in vitro* sobre mecanismos fisiopatogénicos asociados a pancreatitis.
2. Analizar el efecto del tabaco, en comparación con el alcohol, en la activación enzimática intracelular.
3. Estudiar el efecto del tabaco, en comparación con el alcohol, en la secreción enzimática por la célula acinar pancreática.
4. Evaluar el efecto del tabaco, en comparación con el alcohol, en los niveles intracelulares de calcio.
5. Analizar el efecto del tabaco, en comparación con el alcohol, en la producción de especies reactivas del oxígeno asociadas a estrés celular.
6. Evaluar el papel del tabaco, en comparación con el alcohol, en la activación del proceso inflamatorio y la secreción de moléculas proinflamatorias en la célula acinar pancreática.
7. Estudiar el efecto del tabaco, en comparación con el alcohol, en los procesos de muerte celular.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para todos los ensayos realizados se utilizaron ratones Swiss macho adultos de entre 6 y 8 semanas de edad. Los animales se mantienen en ciclos de luz/oscuridad estándar (12 horas luz/ 12 horas oscuridad) bajo el cuidado de personal cualificado.

4.2. REACTIVOS ALCOHOL Y TABACO

Para estudiar el efecto del alcohol en las células acinares pancreáticas se ha utilizado una solución stock de etanol absoluto (17.39 M) (Merck, Alemania) y se han estipulado concentraciones de prueba para los distintos experimentos posteriores en un rango entre 10-100 mM, concentraciones extrapolables al rango de consumo humano, y basándonos en estudios previos (Lu Z. et al, 2002; Dolai S. et al, 2012). Una concentración de 35 mM de alcohol equivale a 0.15 % de alcohol en sangre. Con respecto al tabaco, se ha obtenido el extracto líquido de tabaco de Multipharmaceuticals (Kentucky) en una solución stock de 40 mg/ml y se han estipulado concentraciones de prueba en un rango de 0.001 - 0.4 mg/ml basándonos en estudios en otros tipos celulares (Allam E. et al, 2011). Un cigarrillo contiene 26 mg de extracto de tabaco.

4.3. AISLAMIENTO DE CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS

La metodología utilizada tiene como característica una gran variabilidad en el número de células obtenido en base a diversos factores no controlables (tamaño del páncreas, diferente reacción a la collagenasa por la presencia de una mayor o menor cantidad de vasos, tejido conjuntivo o grasa). Además, algunos acinos conservan su disposición acinar tras la digestión enzimática, lo que hace muy difícil la realización de un conteo totalmente exacto y preciso empleando, por ejemplo, una cámara de Neubauer. Por lo tanto, la variación en el número de células/ml en la solución obtenida trae como consecuencia una falta de homogeneidad que será corregida por otros factores explicados posteriormente en cada subapartado.

Manejo en la obtención de células acinares del páncreas

La manipulación de dichas células se realizó en campana de flujo laminar, con material estéril y en condiciones que garantizaran tanto la esterilidad del cultivo como la seguridad del experimentador.

Soluciones y medios utilizados:

- Medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle medium DMEM (glutamina estable, concentración alta en glucosa [4.5gr/l]).(PAA, GE Healthcare)
- PBS (phosphate buffer saline). Composición (1L):NaCl 136mM(8 g); KCl 2 mM(0.2 g); Na₂HPO 10 mM (1.44 g); KH₂PO₄ 2mM(0.24 g).
- Buffer N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N-(ácido 2-ethanesulfonic) [HEPES] (PAA, GE Healthcare)
- BSA. Suero albumina bovino. (Applichem, Germany)
- Collagenasa (Serva, Heidelberg)

Solución de aislamiento: el medio de cultivo DMEM se complementará con buffer Hepes para mantener el pH de las células constante a 7.4 y suero albumina bovino (BSA) con la finalidad de mantener integras las membranas celulares.

Composición:

DMEM: 90 ml (73%)

Hepes 100 mM: 10 ml (concentración final 8 mM)

BSA 5%: 23 mL (concentración final 1%)

Obtención del páncreas:

El páncreas se obtiene de un ratón macho Swiss adulto sedado con 500 µl de ketamina y sacrificado por dislocación cervical (Fig. 20). Se realiza una incisión en la zona abdominal y se extrae el órgano en condiciones totalmente estériles bajo campana de flujo laminar. Una vez extraído, se procede a lavar durante 5 minutos en una placa petri con PBS y se elimina en la medida de lo posible la grasa, ganglios y vasos sanguíneos.

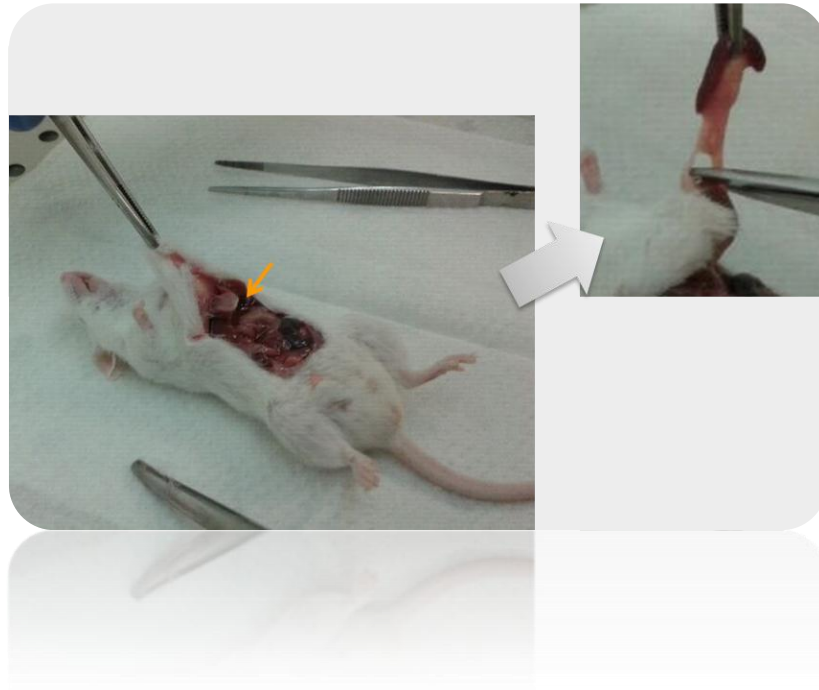


Fig. 20. *Extracción del páncreas de ratón Swiss*

Degradación enzimática:

El páncreas obtenido se deposita en 10 ml de la solución de aislamiento con collagenasa NB4 a 37°C*. La collagenasa es una enzima, una metaloproteinasa, que va a degradar los enlaces peptídicos del colágeno, ayudando así a degradar la matriz extracelular del tejido pancreático. Al inicio de la incubación se disgrega el páncreas con tijeras para ayudar a la posterior degradación enzimática. (*los tiempos de incubación, la concentración y el tipo de collagenasa se detallará en el apartado de *Optimización del Aislamiento de Células Acinares Pancreáticas*)

Degradación mecánica:

Finalizado el tiempo de incubación con collagenasa y en el mismo continente, el tejido pancreático se disgrega de forma mecánica a temperatura ambiente haciéndolo

pasar por distintos diámetros realizados con distintos cortes en puntas de pipetas p1000 (fig. 21). El pipeteo no será muy agresivo con el fin de no dañar las células acinares.

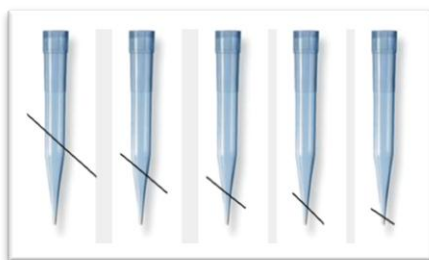


Fig. 21. Distintos diámetros de puntas de pipeta para realizar la degradación mecánica.

Proceso de filtración:

La solución de aislamiento con colagenasa donde se encuentra el tejido degradado se filtra a través de una malla de nylon de 150 micrómetros (fig. 22) con el fin de eliminar otros tipos celulares de mayor tamaño como células ductales pancreáticas o células endocrinas de los islotes de Langerhans y seleccionar las células acinares de interés.



Fig. 22. Malla de filtración (\varnothing 150 μ m)

Proceso de centrifugación:

Una vez filtrada, la suspensión celular se centrifuga* para eliminar la solución con colagenasa y se resuspenden las células en 10 ml solución de aislamiento libre de

colagenasa. (*los tiempos y la velocidad de centrifugación se detallarán en el apartado de *Optimización del Aislamiento de Células Acinares Pancreáticas*)

Se repite el proceso de filtración para garantizar la no contaminación de otros tipos celulares y se vuelve a centrifugar para realizar otro lavado con el fin de eliminar restos de colagenasa.

Incubación:

Una vez obtenidas las células acinares pancreáticas se dejan en reposo en la solución de aislamiento a 37°C durante un mínimo de media hora para su estabilización. Los estudios en estas células se realizarán dentro de las siguientes cuatro horas después del aislamiento.

4.3.1. Optimización del aislamiento de células acinares pancreáticas.

Con el fin de obtener un máximo rendimiento del aislamiento de células acinares, ya que son unas células difíciles de manejar y de difícil mantenimiento en cultivo, se realizaron varias pruebas para optimizar la obtención de las mismas.

El objetivo principal de la optimización del aislamiento celular fue el obtener el mayor número de células posibles con un mayor porcentaje de viabilidad. Para ello se testaron varios tipos de colagenasa, a varias concentraciones y con varios tiempos de incubación. La incubación con colagenasa es un punto crítico en el aislamiento ya que una alta concentración o un alto tiempo de exposición puede dañar a las células o a los receptores de membrana. Por el contrario, una colagenasa inadecuada, concentraciones bajas o tiempos de incubación cortos pueden ocasionar una mala

degradación y una obtención celular deficiente en cantidad. Por otra parte, se probaron varios tiempos de centrifugación para poder obtener el máximo número de células produciendo el mínimo estrés celular y así asegurar una buena viabilidad.

Se testaron los siguientes parámetros:

Colagenasa	Centrifugación (RPM)	Centrifugación (tiempo)
Col. I (Gibco)	500	30 s
Col. II (Gibco)	600	1 min
Col. P	700	3 min
Col. NB4 (Serva)	1.000	5 min
	3.000	10 min

Tabla 2. *Parámetros evaluados para la optimización del aislamiento de células acinares pancreáticas.*

La integridad de la membrana celular se evaluó por respuesta de la célula a dosis supramáximas de Colecistoquinina (100nM)(Sigma, USA) en la activación enzimática intracelular para certificar la funcionalidad de los receptores de membrana.

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de aislamiento se testa el aislamiento ($n \geq 3$) para evaluar número medio aproximado (debido al problema de existencia de acinos) de células obtenidas y el porcentaje de viabilidad de las mismas.

La viabilidad se evaluó mediante exclusión con azul tripán y se expresa en tanto por cien. Se añade a la suspensión celular de dicho colorante al 0,4%, se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente a continuación se hace el conteo celular en la cámara de Neubauer. Las células teñidas de azul se consideraron no viables.

$$\% \text{ de Viabilidad Celular} = \frac{N^{\circ} \text{ de células Totales} - N^{\circ} \text{ de células Muertas}}{N^{\circ} \text{ de células Totales}}$$

Fórmula de contaje:

$$\text{Concentración Celular} = \frac{\text{Células contadas}}{\text{Superficie(mm}^2\text{)} \times \text{Profundidad de la cámara (mm)} \times \text{Factor de dilución}}$$

4.4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA INTRACELULAR

Uno de los principales eventos patogénicos asociados a la pancreatitis crónica es la activación prematura intracelular de tripsinógeno a tripsina. La tripsina (forma activa) va a activar el resto de enzimas pancreáticas (proelastasa, procarboxipeptidasa y quimiotripsinógeno).

Para evaluar la activación intracelular enzimática frente a distintos tóxicos se analiza la actividad de tripsina y de elastasa dentro de la célula acinar por metodología de fluorescencia.

Materiales y reactivos utilizados

- Material de obtención de células acinares pancreáticas (descrito en el apart. 1).
- Buffer de medida. Composición (250 ml): DMEM 1% (2.5 ml), Hepes 24.5mM (6.125 ml), NaCl 96mM (1.4025 g), KCl 6 mM (0.118 g), MgCl₂-6H₂O 1mM (0.05075 g), CaCl₂-2H₂O 0.5mM (0.0184 g), NaH₂PO₄ 2.5mM

(0.086 g), Glucosa 11.5mM (0.5175 g), Fumarato Sódico 5mM (0.200 g), Piruvato Sódico 5mM (0.2112 g), Glutamato Sódico 5mM (0.137 g).

- Fluorocromos:
 - Substrato enzimático rodamina (tripsina): (CBZ-Ile-Pro-Arg)₂-R110 (Molecular Probes, Invitrogen) (fig. 23)
 - Substrato enzimático rodamina (elastasa):(CBZ-Ala-Ala-Ala-Ala)₂-R110 (Molecular Probes, Invitrogen)
 - Ioduro de propidio (Molecular Probes, Invitrogen)

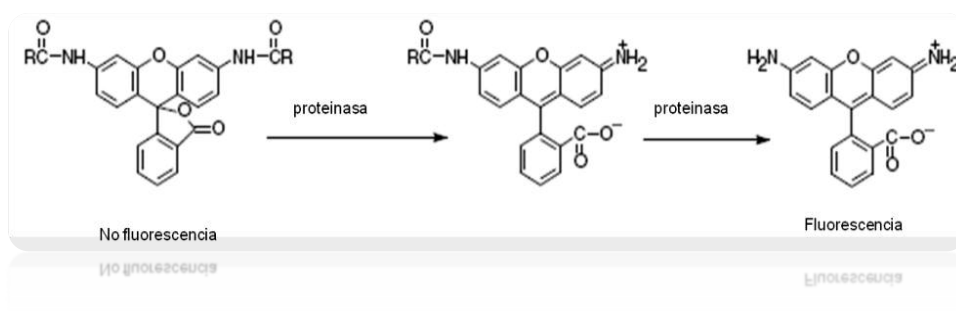


Fig. 23. Estructura de la rodamina

- Triton 100x (Sigma, Saint Louis)
- Lector de placas Fluostar Optima (FLUOstar OPTIMA; BMG Labtech).

Procedimiento (fig. 24)

- Una vez obtenidas las células acinares procedentes de un páncreas de ratón Swiss en ayunas 24 h (aptdo. 1), las células se centrifugan 4 min a 600 g y se resuspenden en 10 ml de medio de cultivo utilizado en el aislamiento (DMEM + Hepes 8mM+ BSA 1%). Los 10 ml de suspensión celular se reparten en 4 matraces de 25 ml, 2.5 ml/matraz y a cada matraz se le añaden 1.5 ml más de medio para tener un volumen total de células de 4 ml por matraz.

- De cada matraz se cogen 900µl para estudiar los niveles basales (sin estímulo) y se ponen en su correspondiente eppendorf. Éstos se denominan niveles basales a tiempo cero.
- Los eppendorf se centrifugan a 12.000 rpm durante 1 minuto para concentrar las células. Se retira el medio y se le añade el buffer de medida con los fluorocromos rodamina y ioduro de propidio. Se vuelve a centrifugar a 12.000 rpm durante 1 min y se cogen 3 veces 200 µl de sobrenadante para cargar la placa (lo que utilizaremos como blanco de cada caso), en las posiciones impares de la placa (señaladas en la imagen)
- Se añaden 400µl más de buffer de medida a cada caso y se resuspenden las células y se homogenizan en cada eppendorf, para analizar la concentración intracelular de enzima. Se cargan 3 réplicas de 200µl de cada caso en las posiciones pares (señaladas en la imagen).
- Después de coger la alícuota del minuto 0, a cada matraz se le pone su correspondiente estímulo y se mantienen en incubación en estufa a 37° con agitación. El matraz 1 será el control negativo (sólo células), el matraz 2 será el control positivo (células estimuladas con 100 nM de CCK) y los matraces 3 y 4 serán las células cargadas con los estímulos a estudio (probando 1 y probando 2, respectivamente) (fig. 25).
- A los 20, 40 y 60 minutos de incubación se repite el proceso anterior para obtener el sobrenadante y la suspensión celular a distintos tiempos y así poder ver la curva de activación enzimática. Se cargarán de la misma manera y en posiciones sucesivas.
- El análisis de la actividad enzimática se realiza midiendo la emisión de fluorescencia del fluorocromo rodamina unido a sustrato específico producida al ser degradado por la enzima pancreática, cuya λ de excitación es de 485nm y una λ de emisión de 520 nm, cuantificada en un espectrofotómetro de placa (FLUOstar OPTIMA; BMG Labtech).

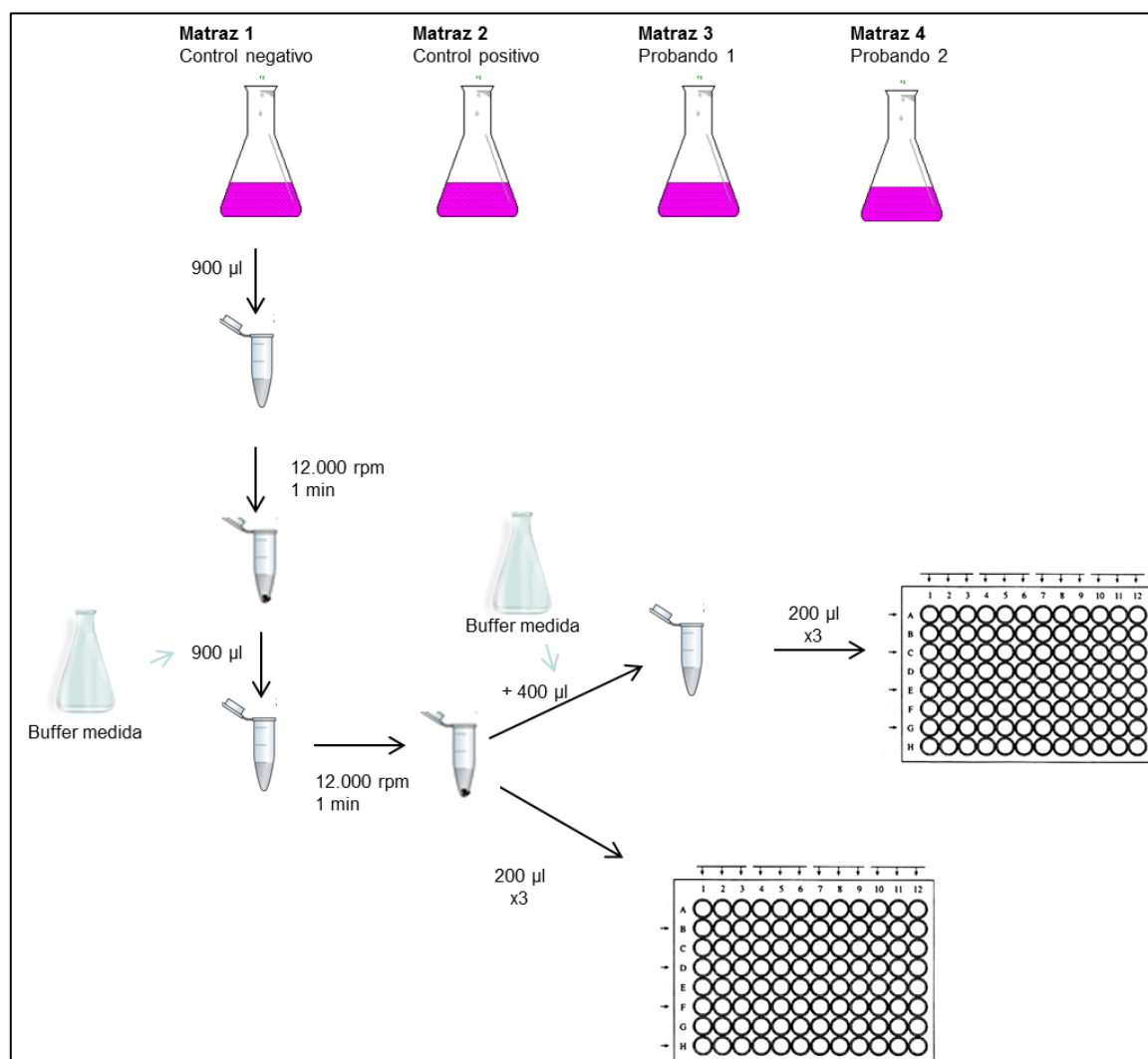


Fig. 24. Esquema del proceso de medición de la actividad enzimática prematura dentro de la célula acinar pancreática.

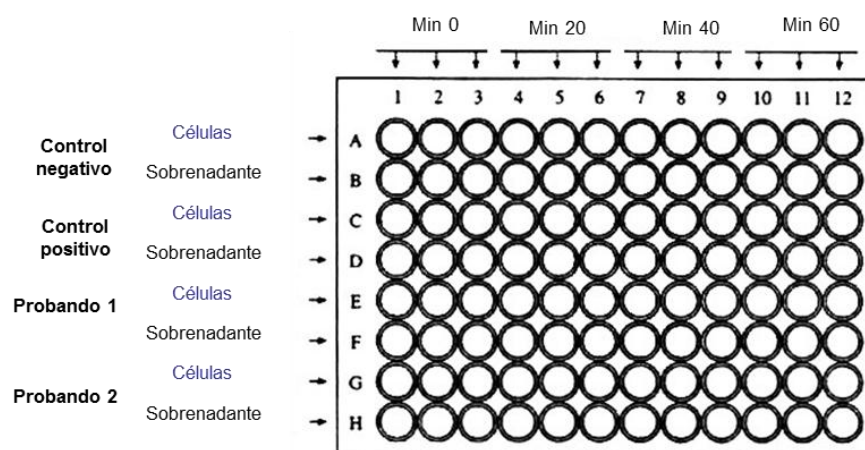


Fig. 25. Esquema de carga de la placa para la medición de la fluorescencia.

Cuando finaliza el proceso la placa se extrae y cada pocillo se carga con 70 μ l de Triton 3x(c_f /pocillo: triton 1x), cuya función es romper las membranas celulares e inducir la necrosis. Dicha necrosis se mide por emisión de fluorescencia de ioduro de propidio en el fluorímetro a una λ de excitación de 535nm y una λ de emisión de 617 nm. De esta manera se obtendrá la necrosis total al final del proceso.

Procesamiento de resultados y Análisis de datos

Una vez cargada la placa después del tiempo de incubación de las células con el estímulo, se deja analizar durante dos horas más por dos motivos: la activación enzimática intracelular no es una respuesta inmediata y, por otra parte, una vez producida la activación, se pueda observar la cinética enzimática de la misma.

Mediante el software informático Optima 2.20 se evalúan los datos del análisis enzimático. En primer lugar se obtiene el “*slope/minute*”, que es el incremento de actividad enzimática, de cada caso y cada tiempo de incubación. Por otra parte, se capta la emisión de fluorescencia del ioduro de propidio para evaluar la necrosis durante el proceso.

Por último al final del proceso, después de tritonizar las células se vuelve a captar la emisión de fluorescencia de ioduro de propidio para evaluar la necrosis al final del proceso.

Con estos datos obtendremos el incremento de activación enzimática por célula viva mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{\text{increm. fluoresc. Rodamina}_{(t=i, c=z)}}{(\text{necrosis final}_{(c=z)} - \text{necrosis}_{(t=i, c=z)})}$$

Donde $t=i$ es el incremento de fluorescencia en un tiempo determinado y $c=z$ es el caso a estudio.

Se realiza una n=5 de cada condición y el análisis estadístico de los datos se realizará con el software SPSS 15.0 y los datos se muestran como media y error típico. Se considera estadísticamente significativo un p valor < 0.05.

Solamente se consideraron válidos aquellos experimentos en los cuales las células responden de forma significativa a la aplicación de CCK.

4.5. ANÁLISIS DE LA SECRECCIÓN DE ENZIMAS PANCREÁTICAS

La evaluación de la secreción enzimática en células acinares pancreáticas en respuesta a los tóxicos a estudio se realizará mediante espectofotometría por cuantificación de amilasa y lipasa.

Materiales y reactivos utilizados

- Material de obtención de células acinares pancreáticas (descrito en el apart 1)
- Buffer de lisis de células acinares pancreáticas. Composición (500 ml): NaH_2PO_4 10 mM (0.6899 g), CaCl_2 4mM (0.2940 g), SDS 10% (5 ml) y BSA 0.1% (0.59 g).
- Substrato enzimático sintético amilasa: p-nitrofenil-maltoheptaósido bloqueado con etilideno (Advia chemistry, Siemens Healthcare).
- Substrato enzimático sintético lipasa: Éster ácido1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico-(6'-metilresorufina) (Advia chemistry, Siemens Healthcare).
- Autoanalizador (Siemens Healthcare)

Procedimiento

- Una vez obtenida la suspensión celular procedente de un páncreas de ratón Swiss en ayunas (aptdo. 1), las células se centrifugan 4 min 600 g y se resuspenden en 10 ml de medio de cultivo utilizado en el aislamiento (DMEM + Hepes 8mM+ BSA 1%) con antibiótico (streptomicina-penicilina, concentración:). Esos 10 ml se reparten en una placa multiwell de 6 pocillos (fig. 26) donde se pone 2.5 ml en cada uno (por cada páncreas, por tanto, se evalúan 4 casos).

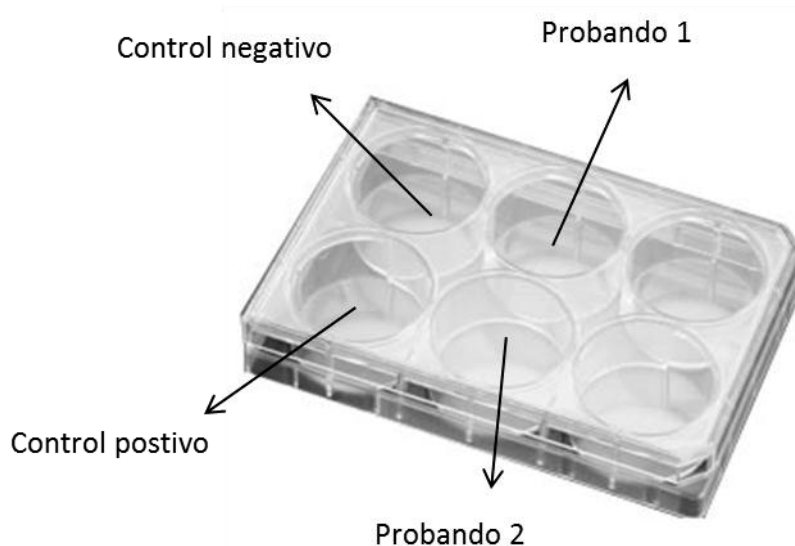


Fig. 26. Placas p6 donde se van a incubar las células acinares pancreáticas con los distintos estímulos.

- Se incuban las células a 37° y 5% CO₂ durante 3 horas y se recogen muestras de 500 µl a 1h, 2h y 3h.
- Cada muestra obtenida se centrifuga durante 1 min a 12.000 rpm. el sobrenadante se traspasa a otro ependorf en el que se analizará la cantidad de enzima extracelular a estudio. El pellet celular se resuspende en buffer de lisis específico de células acinares para cuantificar la cantidad de enzima intracelular (fig. 27).

- Una vez obtenidas las muestras se evalúa la concentración de enzima en cada caso y en cada tiempo en el autoanalizador Siemens a una longitud de onda de 410/694 nm en el caso de la amilasa y de 571/694 nm en el caso de la lipasa.

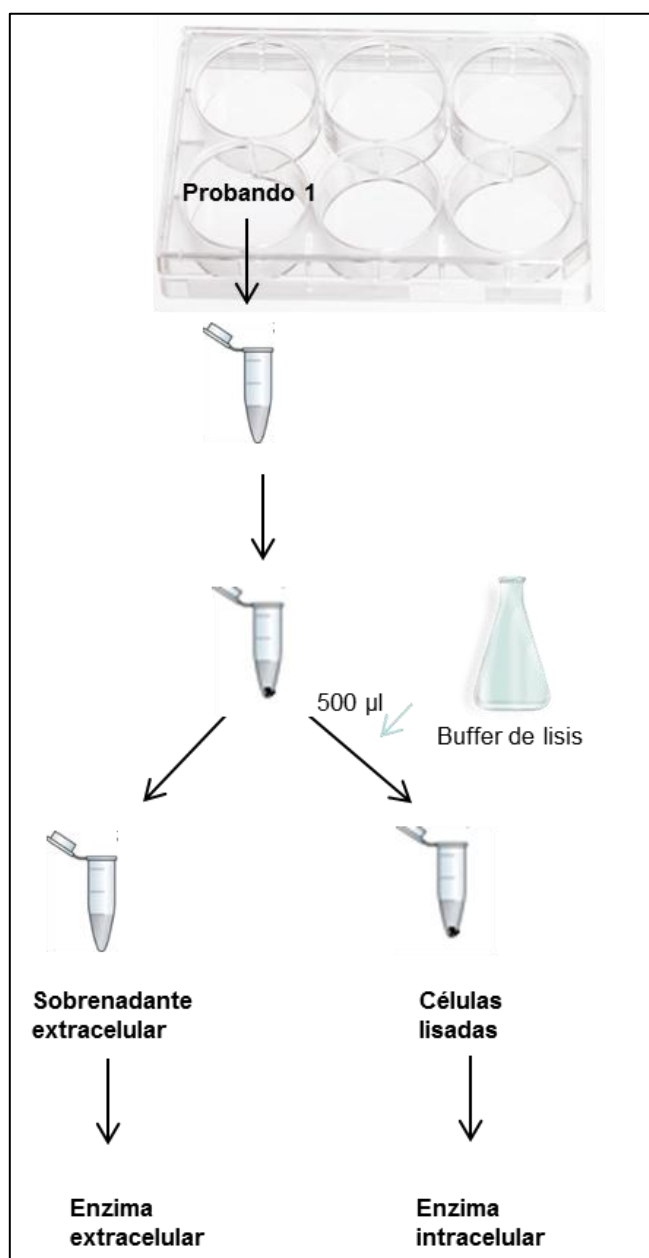


Fig. 27. Esquema del proceso de análisis de secreción de enzimas pancreáticas.

Procesamiento de datos y análisis estadístico

Una vez obtenidos los datos en UI/l se calcula el porcentaje de secreción enzimática en cada caso y en cada tiempo mediante la fórmula:

$$\% \text{ secreción de amilasa} = \frac{[\text{amilasa}]_e}{([\text{amilasa}]_i + [\text{amilasa}]_e)} \times 100$$

Donde se denomina $[\text{amilasa}]_e$ a la concentración de amilasa extracelular y $[\text{amilasa}]_i$ a la concentración de amilasa intracelular.

Se realiza una n=5 de cada condición y el análisis estadístico de los datos se lleva a cabo con el software SPSS 15.0 mediante el análisis de la varianza o ANOVA, tomando un intervalo de confianza del 95% y los datos se muestran como media y error típico. Se considera estadísticamente significativo un p valor < 0.05.

4.6. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE CALCIO INTRACELULARES ($[\text{Ca}^{2+}]_c$)

El incremento de los niveles intracelulares de calcio, junto con la activación enzimática intracelular, es uno de los elementos clave asociados a la patogenia de la pancreatitis crónica y se cree que es el responsable de los demás procesos patológicos.

La variación de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en las células acinares pancreáticas en respuesta a distintos factores tóxicos se evaluó mediante análisis de fluorescencia por sistema de inyección, ya que la respuesta cálcica es muy rápida.

Materiales y reactivos utilizados

- Material de obtención de células acinares pancreáticas (descrito en el aptdo. 1)
- Solución fisiológica de análisis (en mM): NaCl 130; KCl 4,7; CaCl₂ 1.3; MgCl₂ 1; KH₂PO₄ 1.2; glucosa 11; HEPES 10mM
- Substrato del calcio: fluorocromo Fluo-4 (Molecular Probes, Invitrogen)
- Placas multiwell (96 pocillos)

Procedimiento

- Una vez obtenida la suspensión celular procedente de un páncreas de ratón Swiss en ayunas (aptdo. 1), las células se centrifugan 4 min 600 g y se resuspenden en 10 ml de solución fisiológica de análisis fluorocromo fluo-4 AM (2 μ M) (fig. 28), que puede atravesar por difusión la membrana celular, durante 45 min a 37°C.

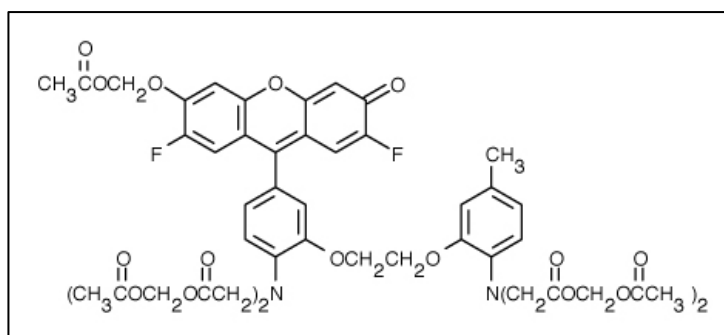


Fig. 28. Estructura de fluo-4

- Posteriormente, la suspensión celular fue de nuevo centrifugada y resuspendida en solución carente de fluorocromo, para eliminar los restos de sonda que no difundieron al interior celular.

- Las células cargadas con el fluo-4 fueron repartidas en una placa *multiwell* de 96 pocillos (100µl/well), óptimos para la medida fluorescente y la fluorescencia fue cuantificada en un espectrofotómetro de placa (FLUOstar OPTIMA; BMG Labtech) cada 5 s durante 90 s con una λ de excitación de 485 nm y una λ de emisión de 520 nm.
- Los estímulos a estudio se añaden mediante un sistema de inyectores automáticos en el propio espectrofotómetro que permiten la administración de los mismos mientras se realiza la medida de fluorescencia de la respuesta inmediata de en la variación de los niveles de calcio.

Procesamiento de datos y análisis estadístico

Debido a la posible variabilidad del número de células en cada pocillo, para la expresión de los resultados de fluorescencia se escoge el aumento absoluto con respecto a los valores basales en cada experimento, y no sus unidades. De ese modo, la respuesta se expresa en porcentaje de incremento de la señal fluorescente obtenida mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ incremento de calcio} = ([Ca]_i/[Ca]_{\text{basal}} - 1) \times 100$$

Donde se denomina $[Ca]_i$ a la concentración máxima de calcio (alcanzada a los 10-15 segundos de la estimulación) y $[Ca]_{\text{basal}}$ a la concentración de calcio al inicio.

Se realiza una n=5 de cada condición. El análisis estadístico entre las medias de los diferentes experimentos fue realizado mediante el análisis de la varianza o ANOVA,

tomando un intervalo de confianza del 95%. Se considera estadísticamente significativo un p valor < 0.05.

Solamente se consideraron válidos aquellos experimentos en los cuales las células responden de forma significativa a la aplicación de CCK.

4.7. ESTUDIO DEL PROCESO INFLAMATORIO

El factor de transcripción NFkappaB activa la expresión de citoquinas proinflamatorias que intervienen en el proceso inflamatorio de la pancreatitis crónica. La interleukina 1 beta es una citoquina proinflamatoria secretada por las células acinares pancreáticas cuando se desencadena el proceso inflamatorio.

El estudio de la presencia de la subunidad p65 de NFKappaB en el citoplasma y/o en el núcleo de la célula acinar pancreática, en respuesta a determinados estímulos, como marcador de activación del proceso inflamatorio se estudió mediante la metodología de Western Blot y la secreción de interleucina 1 beta como marcador de respuesta proinflamatoria mediante EnzimoinmunoEnsayo.

4.7.1. Estudio del factor de transcripción NFKappaB

Materiales y reactivos utilizados

- Buffer A: Hepes 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1mM y KCl 10mM.
- Buffer C: 1ml buffer A, 10 µL DTT, 10 µL antiproteasas.
- Buffer N: 644 µL Buffer C, 156 µL KCl (stock 2.5M), 200 µL Glicerol

- NP 40 (solución stock: 10%)
- Glicerol
- KCl (solución stock: 2.5 M)
- Reactivos para geles Western Blot: Acrilamida (Aplichem, Germany), Temed (Sigma, USA), SDS 10%: 10 gr de SDS (Sigma, USA)+ 100 ml de agua destilada, APS 10%: 100 mg de APS + 1 ml de agua destilada, Tris básico, pH 8.8 1.5 M: 2.72 g Trizma Base (Sigma, USA)+ 15 ml de agua destilada, Tris-ácido, pH 6.8 1M: 1.81 g de Trizma Base (Sigma, USA) + 15 ml de agua destilada.
- Sample buffer 5X: SDS 10% (2 gr), Tris-ácido 400mM (8 ml), Glicerol 50% (10 ml), Azul bromofenol 0.5% (0.1 g) y Beta mercaptoetanol 5% (1ml)
- Solución de bloqueo con BSA (para 2 westerns): BSA 5% (1.5 g), PBS 1X (30 ml) y Tween 20 (30 µl)
- Buffer electroforesis: Glicina (14.4 g), Tris-básico (3.33 g), SDS (1 g)
- Buffer transferencia: Tris-básico 25 Mm (3.03 g), Glicina 192 mM (14.4 g) y Metanol (200 ml)
- Mercaptoetanol (Sigma, USA)
- Marcador de peso molecular (Pierce, Thermo Scientific)

Extracción proteica fragmentos celulares (núcleo y citoplasma)

- Una vez obtenida la suspensión celular procedente de un páncreas de ratón Swiss en ayunas (aptdo. 1), las células se centrifugan 4 min 600 g y se resuspenden en 10 ml de medio de cultivo y se distribuyen en placas multiwell de 6 pocillos, se administra el estímulo probando en cada caso y se incuba durante 3 horas.
- Tras la incubación de las células acinares pancreáticas en pocillos p6 con los distintos estímulos, se recoge la suspensión celular (2 ml) y se deposita en un eppendorf.

- Los pocillos se lavan con 1ml de PBS para eliminar restos de medio. Los eppendorf se centrifugan 1 min a 12.000 rpm, se retira el sobrenadante y al pellet se le añade 1 ml de PBS (lavado). Se vuelve a centrifugar 1min a 12.000 rpm y se retira el PBS.
- Se añaden 200 µL de buffer C al pocillo de cada caso, se raspa con la punta de la pipeta por si alguna célula se hubiese quedado pegada al fondo. Esos 200 µL se recogen y se transfieren al eppendorf correspondiente del mismo caso donde está el pellet celular. Se resuspende el pellet y se incuban 15 minutos en hielo con el buffer C.
- Se le añade NP40, 0.5% (10µL) a cada caso y se incuba 10 minutos en hielo. Vortex 15 seg.
- Centrifugación 200 g durante 5 minutos para eliminar las células que no se lisaron. El sobrenadante se pasa a otro eppendorf y se centrifuga durante 15 minutos a 1.500 g. El sobrenadante resultado de dicha centrifugación será la PROTEINA CITOPASMÁTICA.
- El pellet resultante de la anterior centrifugación son los núcleos. Se realiza un lavado con buffer C para eliminar restos de proteína citoplasmática (centrifugación 1.500 g 15 minutos). Se retira el sobrenadante y se dejan secar bien. Posteriormente se añaden 30µL del buffer N. Se incuba durante 30 minutos en hielo, vortexeando cada 5 minutos.
- Centrifugación 15 minutos a 15.000 g. el sobrenadante obtenido será la PROTEÍNA NUCLEAR.

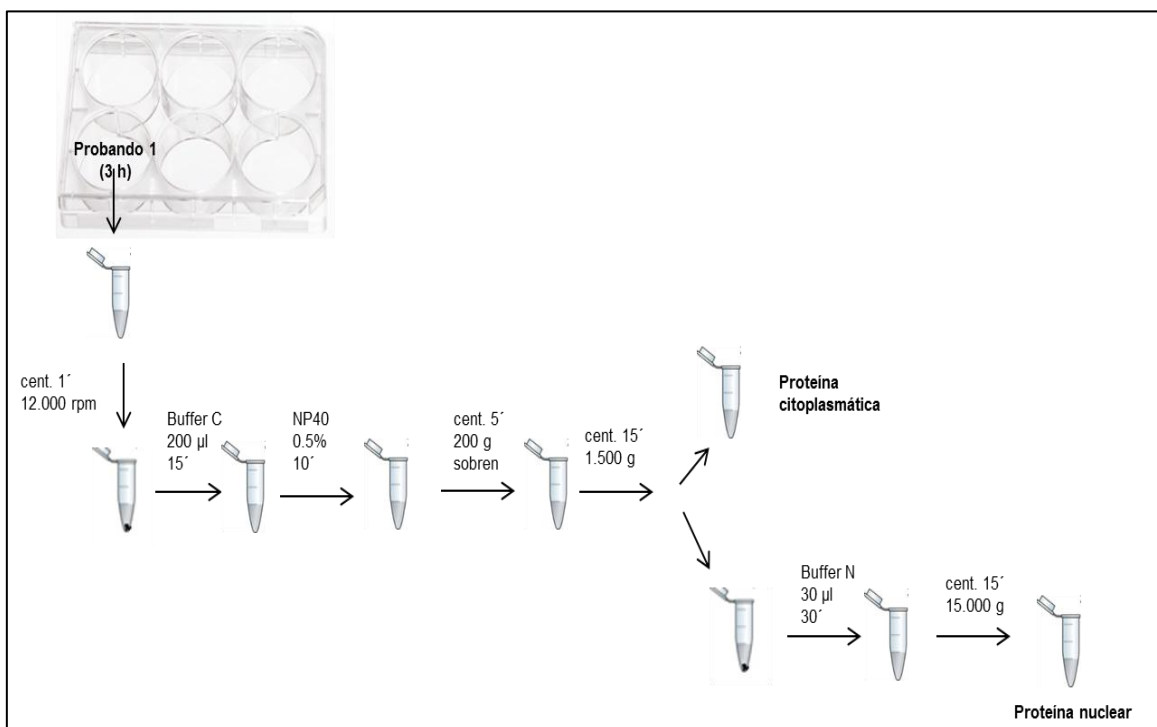


Fig. 29. Esquema del proceso de obtención de fragmentos celulares (proteína citoplasmática y nuclear)

Cuantificación proteica. Bradford.

Recta de calibrado: Se construye una recta de 6 puntos con concentraciones decrecientes de BSA, partiendo de una solución stock 2mg/ml y haciendo diluciones seriadas (fig. 30).

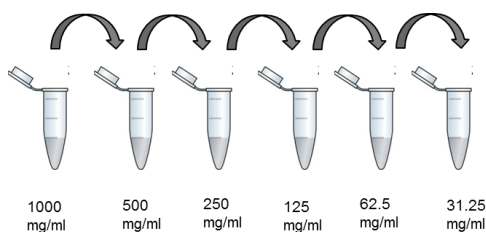


Fig. 30. Diluciones seriadas de la recta patrón

Preparación de las muestras para cuantificación: En cada caso se hace una dilución de la muestra 1:20. El blanco, al igual que las muestras, se prepara diluyendo 1 µl de buffer C + 19 µl de agua destilada. A continuación se añaden 600 µL del reactivo

Coomassie a las muestras y a las soluciones patrón y tras 10 minutos y se mide la absorbancia a 450 nm.

$$\mu\text{g}/\mu\text{l} = (\mu\text{g}/\text{ml d muestra} * 20)/1000$$

Western blot

- Preparación del Gel de poliacrilamida (10%): (Cantidades para dos geles)
 - Separador, Acrilamida 10% (15ml): agua, acrilamida, TRIS pH 8.8. 1.5M, SDS, APS, Temed
 - Concentrador, Acrilamida 5% (10ml): Agua, Acrilamida, TRIS pH 6.8. 1.0M, SDS, APS, Temed
- Preparación de las muestras para cargar en el gel: se carga en el gel 30 μg de cada muestra. Para ello se calcula los μl necesarios para cargar 30 μg . fórmula utilizada:

$$\mu\text{l} = 30 \mu\text{g} / (\mu\text{g}/\mu\text{l d muestra}).$$

En muestra para cargar:

$$x \text{ de proteína} + (20\mu\text{l} - x) \text{ de agua} + 5 \mu\text{l sample buffer 5x}$$

- Electroforesis: Se realizó la separación de proteínas que hay en una muestra en base a su peso molecular y a su carga eléctrica mediante electroforesis a un voltaje constante de 70 mv hasta llegar a la parte del gel separadora y a partir de ahí, a 90 mv. Los geles de poliacrilamida se cargaron como se indica en el esquema, poniendo en primer lugar el marcador de peso molecular. Se utiliza un sistema de electroforesis de Biorad.

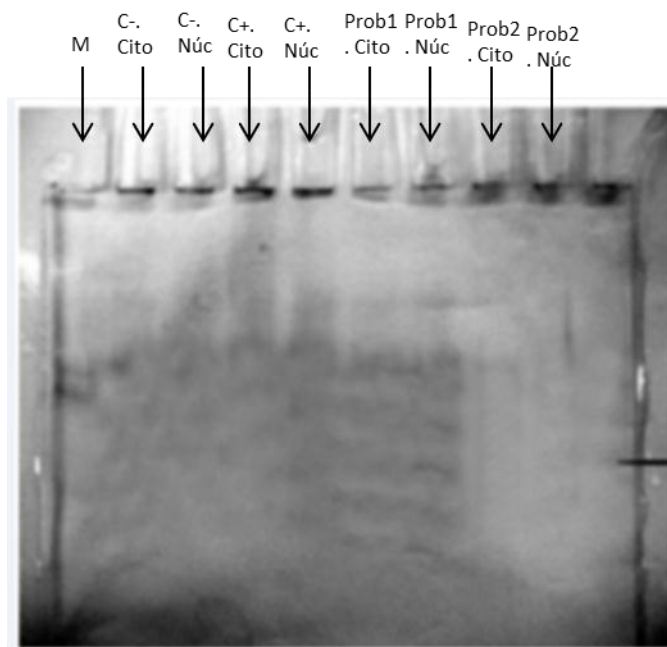


Fig. 31. Esquema de carga de las proteínas en el gel.

- Transferencia: Se realizó la transferencia de las proteínas separadas en la electroforesis a una membrana adsorbente de nitrocelulosa mediante un sistema semi-seco de la casa comercial Biorad, según indica el esquema. Este proceso se realiza a un amperaje constante de 200mA, siempre y cuando el voltaje no exceda de 20v, durante 45 minutos.
- Bloqueo: La membrana de nitrocelulosa que contiene las proteínas se incubaba durante una hora con BSA5% en PBS'T para bloquear los sitios de anclaje inespecíficos a los anticuerpos.
- Anticuerpo primario: cada membrana se incubaba con anticuerpo anti-p65 1:500 (Santa Cruz,) en PBS'T-BSA 5% durante toda la noche a 4°C.
- Lavados: se realizan 3 lavados con PBS'T de 15 minutos cada uno, para eliminar el anticuerpo primario no anclado.
- Incubación con anticuerpo secundario: cada membrana se incubaba con anticuerpo anti-rabbit 1:1.500 (Santa Cruz Biotechnology, California) en PBS'T-BSA 5% durante 1 hora a Temperatura Ambiente.

- Lavados: se realizan 3 lavados con PBS-T de 15 minutos cada uno, para eliminar el anticuerpo secundario no anclado.
- Revelado: mediante electroquimioluminiscencia(*Pierce ECL*, Thermo Scientific)
- Análisis de bandas por densitometría (Image J software)

Procesamiento de datos y análisis estadístico

Una vez densitometrada cada banda se calcula la proporción núcleo/citoplasma de cada caso, así como el porcentaje de traslocación al núcleo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ traslocación} = \frac{\text{p65 núcleo}}{(\text{p65 citoplasma} + \text{p65 núcleo})} \times 100$$

Se realizó una n=5 de cada condición. El análisis estadístico entre las medias de los diferentes experimentos se llevó a cabo con el software estadístico SPSS 15.0 mediante el análisis de la varianza o ANOVA, tomando un intervalo de confianza del 95%. Se considera estadísticamente significativo un p valor < 0.05.

4.7.2. Análisis de interleukina 1 beta

Materiales y reactivos utilizados

- Material de obtención de células acinares pancreáticas (descrito en el aptdo. 1)
- Kit IL1 beta (R&D systems, Minneapolis):
 - Mouse IL1B control
 - Wash buffer
 - Mouse IL1B estándar
 - Solución sustrato (reactivos A y B)
 - Solución STOP

Procedimiento

- Una vez obtenida la suspensión celular procedente de un páncreas de ratón Swiss en ayunas (aptdo. 1), las células se centrifugan 4 min 600 g y se resuspenden en 10 ml de medio de cultivo y se distribuyen en placas multiwell de 6 pocillos, se administra el estímulo probando en cada caso y se incuba durante 3 horas.
- Tras la incubación de las células acinares pancreáticas en pocillos p6 con los distintos estímulos, se recoge la suspensión celular y se deposita en un eppendorf, se centrifugan 1 min a 12.000 rpm y se obtiene el sobrenadante para evaluar la interleukina a estudio mediante ELISA.

ELISA (R&D systems, Minneapolis)

- Preparación de reactivos: El reactivo Mouse Il1B control se disuelve en 1 ml de agua destilada. Los 25 ml de wash buffer se diluyen en 600ml de agua destilada.
- Recta de calibrado (fig. 32): El mouse 1 beta estándar se reconstituye en 5 ml de Calibrator diluent RDS-L6 y se obtiene una solución stock de 800 pg/ml. Se pone en agitación suave 5 minutos antes de hacer las diluciones.

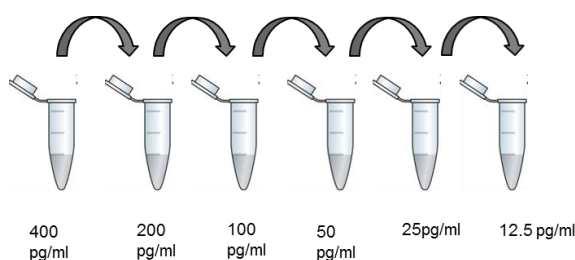


Fig. 32. Diluciones seriadas de la recta patrón

- Se añade 50 µl de Assay diluent RD1N a cada pocillo, para reconstituir el anticuerpo primario.
- Se añaden 50 µl del estándar, control o muestra por pocillo y se incuban 2 horas a temperatura ambiente.
- Hacer 5 lavados con 400 µl de wash buffer, decantar y secar bien.
- Se añaden 100 µl de mouse Il1 B conjugado (anticuerpo secundario) e incuban 2 horas a temperatura ambiente.
- Hacer 5 lavados con 400 µl de wash buffer, decantar y secar bien.
- Se añaden 100 µl de solución substrato a cada pocillo y se incuban 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.

- Posteriormente se añaden 100 μ l Stop Solution
- Se determina la λ a 450 nm.

Procesamiento de datos y análisis de resultados

Los datos obtenidos se mostrarán en pg/ml y se expresarán como medias y error típico.

Se realiza una n=5 de cada condición. El análisis estadístico entre las medias de los diferentes experimentos fue realizado mediante el análisis de la varianza o ANOVA, tomando un intervalo de confianza del 95%. Se considera estadísticamente significativo un $p < 0.05$.

4.8. ANÁLISIS DE PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) se producen en la mitocondria dentro de la célula en condiciones adversas. Las especies reactivas del oxígeno producen fragilidad de membrana y desestabilización celular, considerándose un evento patofisiológico.

La evaluación de la producción de ROS frente a distintos agentes tóxicos se utilizó el la metodología de análisis por fluorescencia.

Materiales y reactivos utilizados

- Material de obtención de células acinares pancreáticas (descrito en el aptdo. 1)
- Buffer de medida. Composición (250 ml): DMEM: 2.5 ml, Hepes: 6.125 ml, NaCl 1.4025 g, KCl 0.118 g, MgCl₂-6H₂O 0.05075 g, CaCl₂-2H₂O 0.0184 g, NaH₂PO₄ 0.086 g, Glucosa: 0.5175 g, Fumarato Sódico 0.200 g, Piruvato Sódico 0.2112 g, Glutamato Sódico: 0.137 g
- Fluorocromos:
 - Substrato diclorofluoresceína diacetato (HDCFDA) (Sigma Aldrich, USA)
 - Ioduro de propidio (Invitrogen, Molecular Probes)

Procedimiento

- Una vez obtenida la suspensión celular procedente de un páncreas de ratón Swiss en ayunas (aptdo. 1), las células se centrifugan y se resuspenden en 10 ml de buffer de medida.
- Al buffer de medida se le administra la sonda fluorogénica HDCFDA (12μM) durante 30 minutos para que el fluorocromo entre en la célula. El HDCFDA porta una carga negativa adicional que le proporciona su retención dentro de la célula. Este fluorocromo se vuelve fluorescente después de ser oxidado.

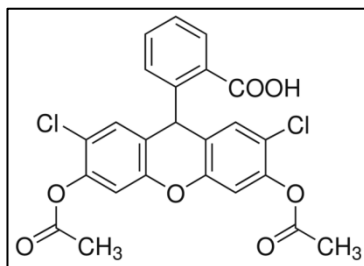


Fig. 33. Estructura HDCFDA

- Transcurrido este tiempo se centrifuga la suspensión celular para eliminar el fluorocromo que no ha permeabilizado dentro de la célula. Se resuspenden las muestras en 12 ml de buffer de medida con el sustrato ioduro de propidio para medir la necrosis celular.
- La suspensión celular se distribuye en ependorf, se le administran los estímulos correspondientes a cada caso y se carga la placa multiwell de 96 pocillos realizando 3 réplicas de 200 μ l por caso.
- Se realiza el análisis de fluorescencia durante 3 horas en el lector de placas FLUOstar OPTIMA; BMG Labtech, haciendo una evaluación de la fluorescencia emitida por el fluorocromo HDCFDA cuya λ de excitación de 485 nm y una λ de emisión de 520nm.

Procesamiento de datos y análisis de resultados

Los datos se extraen del software informático OPTIMA y se muestran como curva de incremento hasta las 3 horas. Los datos extraídos a las 3 horas de incubación de cada caso se muestran como media de unidades de fluorescencia.

Se realiza una $n=5$ de cada condición. El análisis estadístico entre las medias de los diferentes experimentos fue realizado mediante el análisis de la varianza o ANOVA, tomando un intervalo de confianza del 95%. Se considera estadísticamente significativo un $p < 0.05$.

4.9. ESTUDIO DE MUERTE CELULAR EN CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS

Los procesos de muerte celular se asocian a desarrollo de inflamación y se cree que son consecuencia de otros eventos patogénicos provocados en la célula acinar. La muerte celular puede estar provocada de manera directa o indirecta por agentes tóxicos, como el alcohol o el tabaco. Para estudiar la muerte de la célula acinar pancreática en respuesta a distintos tóxicos se ha utilizado la técnica de fluorimetría analizando el ioduro de propidio y espectrofotometría, analizando la producción de lactato deshidrogenasa.

4.9.1. Necrosis celular

Materiales y reactivos utilizados

- Material de obtención de células acinares pancreáticas (descrito en el aptdo. 1).
- Buffer de medida. Composición (250 ml): DMEM 1% (2.5 ml), Hepes 24.5mM (6.125 ml), NaCl 96mM (1.4025 g), KCl 6 mM (0.118 g), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1mM (0.05075 g), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.5mM (0.0184 g), NaH_2PO_4 2.5mM (0.086 g), Glucosa 11.5mM (0.5175 g), Fumarato Sódico 5mM (0.200 g), Piruvato Sódico 5mM (0.2112 g), Glutamato Sódico 5mM (0.137 g).
- Fluorocromo: Ioduro de propidio (Invitrogen, Molecular Probes)
- Triton 100x (Sigma, Saint Louis)
- Lector de placas Fluostar Optima (BMG Labtech)

Procedimiento

- Una vez obtenidas las células acinares procedentes de un páncreas de ratón Swiss en ayunas 24 h (aptdo. 1), se centrifugan 4 min 600 g y se resuspenden en 10 ml de medio de cultivo utilizado en el aislamiento (DMEM + Hepes 8mM+ BSA 1%). Los 10 ml de suspensión celular se reparten en 4 matraces de 25 ml, 2.5 ml/matraz y a cada matraz se le añaden 1.5 ml más de medio para tener un volumen total de células de 4 ml por matraz.
- De cada matraz se cogen 900 µl para estudiar los niveles basales (sin estímulo) y se ponen en su correspondiente eppendorf. Éstos se denominan niveles basales a tiempo cero.
- Los eppendorf se centrifugan a 12.000 rpm durante 1 minuto para concentrar las células. Se retira el medio y se le añade el buffer de medida con el fluorocromo ioduro de propidio. Se vuelve a centrifugar 12.000 rpm, 1 min y se cogen 3 veces 200µl de sobrenadante para cargar la placa (lo que utilizaremos como blanco de cada caso), en las posiciones impares de la placa (señaladas en la imagen)
- Se añaden 400 µl más de buffer de medida a cada caso y se resuspenden las células y se homogenizan en cada eppendorf, para analizar la concentración intracelular de enzima. Se cargan 3 réplicas de 200µl de cada caso en las posiciones pares (señaladas en la imagen).
- Después de coger la alícuota del minuto 0, a cada matraz se le pone su correspondiente estímulo y se mantienen en incubación en estufa a 37°C con agitación. El matraz 1 será el control negativo (sólo células), el matraz 2 será el control positivo (células estimuladas con 100 nM de CCK) y los matraces 3 y 4 serán las células cargadas con los estímulos a estudio (probando 1 y probando 2, respectivamente)
- A los 20, 40 y 60 minutos de incubación se repite el proceso anterior para obtener el sobrenadante y la suspensión celular para evaluar la

necrosis a distintos tiempos. Se cargarán de la misma manera y en posiciones sucesivas.

- El análisis de la necrosis se realiza midiendo la emisión de fluorescencia del fluorocromo ioduro de propidio intercalado en el ADN, cuya λ de excitación es de 535nm y una λ de emisión de 617 nm, cuantificada en un espectrofotómetro de placa (FLUOstar OPTIMA; BMG Labtech).
- Cuando finaliza el proceso la placa se extrae y cada pocillo se carga con 70 μ l de Triton 3x (c_f poc: triton 1x), cuya función es romper las membranas celulares e inducir la necrosis. Se vuelve a medir la necrosis y de esta manera se obtendrá la necrosis total al final del proceso.

Procesamiento de resultados y Análisis de datos

Mediante el software informático Optima 2.20 se evalúan los datos del análisis enzimático. En primer lugar se obtiene la necrosis producida en la hora 1, hora 2 y hora 3 de incubación de cada caso. Por otra parte, se capta la emisión de fluorescencia del ioduro de propidio para evaluar la necrosis durante el proceso.

Por último al final del proceso, después se tritonizar las células se vuelve a captar la emisión de fluorescencia de ioduro de propidio para evaluar la necrosis al final del proceso.

Con estos datos obtendremos el porcentaje mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Necrosis} = \frac{\text{necrosis}_{(t=i, c=z)} - \text{necrosis}_{(t=i-1, c=z)}}{\text{necrosis final}_{(c=z)}} \times 100$$

Se realiza una n=5 de cada condición. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con el software SPSS 15.0 mediante ANOVA y los datos se muestran como media y error típico. Se considera estadísticamente significativo un $p < 0.05$.

4.9.2. Citotoxicidad

Medida de la citotoxicidad celular de las células acinares pancreáticas en respuesta a distintas concentraciones de agentes tóxicos mediante la producción de lactato deshidrogenasa. La enzima lactato deshidrogenasa se encuentra en el citoplasma celular y se libera al exterior cuando la célula se permeabiliza, indicando muerte celular afectada por algún tóxico.

Material y reactivos utilizados

- Material de obtención de células acinares pancreáticas (descrito en el apdo. 1).
- Buffer de medida. Composición (250 ml): DMEM 1% (2.5 ml), Hepes 24.5mM (6.125 ml), NaCl 96mM (1.4025 g), KCl 6 mM (0.118 g), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1mM (0.05075 g), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.5mM (0.0184 g), NaH_2PO_4 2.5mM (0.086 g), Glucosa 11.5mM (0.5175 g), Fumarato Sódico 5mM (0.200 g), Piruvato Sódico 5mM (0.2112 g), Glutamato Sódico 5mM (0.137 g).
- Cytotoxicity detection kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)

Procedimiento

La citotoxicidad celular se evaluó por la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), un indicador de la integridad de membrana y viabilidad celular.

La detección de la LDH se realizó mediante un test colorimétrico (Cytotoxicity detection kit, LDH).

- Una vez aisladas las células, después de la media hora de incubación, se centrifugan a 600 rpm durante 4 minutos, para eliminar el medio de aislamiento y resuspenderlas en buffer de medida.
- Se ponen 200 μ l de suspensión celular en cada pocillo de una placa de 96 multiwell y se le administran los distintos estímulos (alcohol o tabaco a distintas concentraciones).
- Se incuba la placa durante 3 horas. Posteriormente a los pocillos de las células de lisis se le induce la lisis celular administrando 50 μ L de Dye Solution y se deja incubar 15 minutos. En este momento se inicia el procedimiento de evaluación de la liberación de LDH (fig. 34).
- Para ello se procede a preparar en el momento la solución de catálisis (11.250 ml de la sustancia 1 + 250 μ l de la sustancia 2 del kit). Se administra a cada pocillo 100 μ l de la solución de Catalisis y se incuba durante 20 minutos a 37°C, protegido de la luz. Posteriormente, se añade 50 μ L de la solución STOP y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 492 nm.

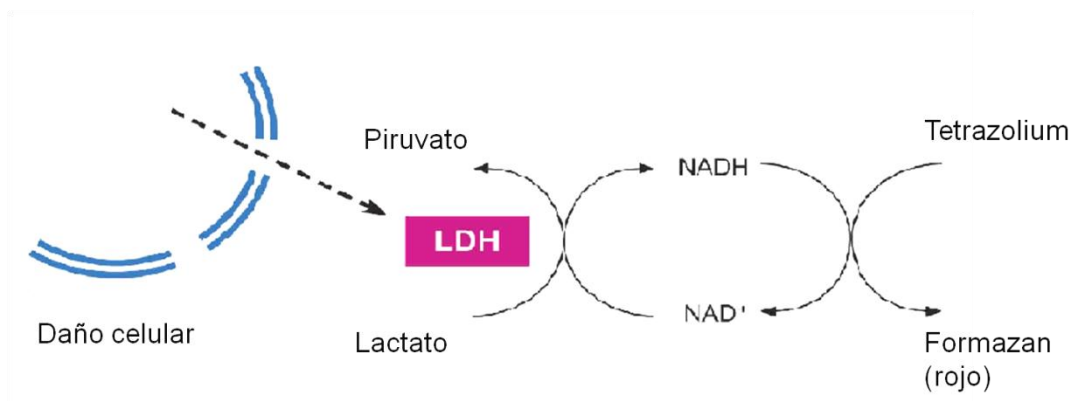


Fig. 34. Liberación de lactato deshidrogenasa en situación de daño celular y detección mediante colorimetría.

Procesamiento de datos y análisis estadístico

La producción de lactato deshidrogenasa se mostrará en unidades de absorbancia y el incremento de producción en cada muestra como incremento en referencia al control negativo. El porcentaje de citotoxicidad se expresa según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \frac{\text{abs}_{(x)} - \text{abs}_{(\text{basal})}}{\text{abs}_{(\text{lisado})} - \text{abs}_{(\text{basal})}} \times 100$$

De cada caso se realizará una n=5 de cada condición. El análisis estadístico entre las medias de los diferentes experimentos fue realizado mediante el análisis de la varianza o ANOVA, tomando un intervalo de confianza del 95%. Se considera estadísticamente significativo un $p < 0.05$.

4.9.3. Apoptosis

Para evaluar la apoptosis producida en la célula acinar pancreática en respuesta a distintos estímulos tóxicos, se evalúa la activación de caspasa 3 mediante Western Blot.

Materiales y reactivos utilizados

- Buffer A: Hepes 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1mM y KCl 10mM.

- Buffer C: 1ml buffer A, 10 μ L DTT, 10 μ L antiproteasas.
- NP 40 (solución stock: 10%)
- Glicerol
- KCl (solución stock: 2.5 M)
- Reactivos para geles Western Blot: Acrilamida (Aplichem, Germany), Temed (Sigma, USA), SDS 10%: 10 gr de SDS (Sigma, USA)+ 100 ml de agua destilada, APS 10%: 100 mg de APS + 1 ml de agua destilada, Tris básico, pH 8.8 1.5 M: 2.72 g Trizma Base (Sigma, USA)+ 15 ml de agua destilada, Tris-ácido, pH 6.8 1M: 1.81 g de Trizma Base (Sigma, USA) + 15 ml de agua destilada.
- Sample buffer 5X: SDS 10% (2 gr), Tris-ácido 400mM (8 ml), Glicerol 50% (10 ml), Azul bromofenol 0.5% (0.1 g) y Beta mercaptoetanol 5% (1ml)
- Solución de bloqueo con BSA (para 2 westerns): BSA 5% (1.5 g), PBS 1X (30 ml) y Tween 20 (30 μ l)
- Buffer electroforesis: Glicina (14.4 g), Tris-básico (3.33 g), SDS (1 g)
- Buffer transferencia: Tris-básico 25 Mm (3.03 g), Glicina 192 mM (14.4 g) y Metanol (200 ml)
- Mercaptoetanol (Sigma, USA)
- Marcador de peso molecular (Pierce, Thermo Scientific)

Obtención proteica

- Una vez obtenida la suspensión celular procedente de un páncreas de ratón Swiss en ayunas (aptdo1), las células se centrifugan 4 min 600 g y se resuspenden en 10 ml de medio de cultivo y se distribuyen en placas multiwell de 6 pocillos, se administra el estímulo en cada caso y se incuba durante 3 horas.

- Tras la incubación de las células acinares pancreáticas en pocillos p6 con los distintos estímulos, se recoge la suspensión celular (2ml) y se deposita en un eppendorf.
- Los pocillos se lavan con 1ml de PBS para eliminar restos de medio. Los eppendorf se centrifugan 1 min a 12.000 rpm, se retira el sobrenadante y al pellet se le añade 1 ml de PBS (lavado). Se vuelve a centrifugar 1min a 12.000 rpm y se retira el PBS.
- Se añaden 100 μ L de buffer de lisis de células acinares al pocillo de cada caso y se raspa con la punta de la pipeta por si alguna célula se hubiese quedado pegada al fondo. Esos 100 μ L se recogen y se transfieren al eppendorf correspondiente del mismo caso donde está el pellet celular. Se resuspende el pellet y se incuban 30 minutos en hielo con el buffer de lisis.
- Se le añade NP40, 0.5% (10 μ L) a cada caso y se incuba 10 minutos en hielo. Vortex 15 seg.
- Centrifugación 200 g durante 5 minutos para eliminar las células que no se lisaron. El sobrenadante se pasa a otro eppendorf y se centrifuga durante 15 minutos a 1.500 g. El sobrenadante resultado de dicha centrifugación contendrá la proteína que se utilizará para evaluar la activación de caspasa 3.

Cuantificación proteica. Bradford. (mismo protocolo que en el apdo. 3.7.1.)

Western blot

- Preparación del Gel de poliacrilamida (12%): (Cantidades para dos geles)
 - Separador, Acrilamida 12% (15ml): agua, acrilamida, TRIS pH 8.8. 1.5M, SDS, APS, Temed

- Concentrador (10ml): Agua, Acrilamida, TRIS pH 6.8. 1.0M, SDS, APS, Temed
- Preparación de las muestras para cargar en el gel: se carga en el gel 30 μg de cada muestra. Para ello se calcula los μl necesarios para cargar 30 μg . fórmula utilizada: $\mu\text{l} = 30 \mu\text{g} / (\mu\text{g}/\mu\text{l} \text{ d muestra})$.

En muestra para cargar:

x de proteína + (20 μl -x) de agua + 5 sample buffer 5x

- Electroforesis: Se realizó la separación de proteínas que hay en una muestra en base a su peso molecular y a su carga eléctrica mediante electroforesis a un voltaje constante de 60mv. Los geles de proliacrilamida se cargaron como se indica en el esquema, poniendo en primer lugar el marcador de peso molecular. Se utiliza un sistema de electroforesis de Biorad.
- Transferencia: Se realizó la transferencia de las proteínas separadas en la electroforesis a una membrana adsorbente de nitrocelulosa mediante un sistema semi-seco de la casa comercial Biorad, según indica el esquema. Este proceso se realiza a un voltaje constante de 12 v, durante 1 hora.
- Bloqueo: La membrana de nitrocelulosa se incuba durante una hora con BSA5% en PBS'T para bloquear los sitios de anclaje inespecíficos a los anticuerpos.
- Anticuerpo primario: cada membrana se incuba con anticuerpo anti-caspasa 3 clivada 1:250 (Calbiochem, Germany) en PBS'T-BSA 5% durante toda la noche a 4°C.
- Lavados: se realizan 3 lavados con PBS'T de 15 minutos cada uno, para eliminar el anticuerpo primario no anclado.

- Incubación con anticuerpo secundario: cada membrana se incubaba con anticuerpo anti-rabbit 1:1.000 (Santa Cruz Biotechnology, California) en PBS-T-BSA 5% durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavados: se realizan 3 lavados con PBS-T de 15 minutos cada uno, para eliminar el anticuerpo secundario no anclado.
- Revelado: mediante electroquimioluminiscencia (*Pierce ECL*, Thermo Scientific)
- Análisis de bandas por densitometría (Image J software)

Procesamiento de datos y análisis estadístico

Los resultados se expresaran como cantidad de densitometría de cada caso y diferencia de expresión en referencia al control negativo.

Se realiza una n=5 de cada condición. El análisis estadístico entre las medias de los diferentes experimentos fue realizado mediante el análisis de la varianza o ANOVA, tomando un intervalo de confianza del 95%. Se considera estadísticamente significativo un p valor < 0.05.

4.10. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela, cumpliendo la normativa de Manipulación de Animales Experimentales y de Laboratorio con la Ley Internacional de Experimentación Animal.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE AISLAMIENTO DE CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS

Debido a la problemática de que las células acinares pancreáticas son un gran almacén de proteasas y su activación induce procesos de degradación proteica, el aislamiento de este tipo celular debe llevarse a cabo en las condiciones más óptimas con el fin de paliar al máximo dicho contratiempo. Para ello se testaron distintos tipos de colagenasa y distintos tiempos y velocidades de centrifugación.

Los tipos de colagenasas testadas fueron las colagenasas I, II, P y NB4. Estas colagenasas han sido descritas como utilizadas en el aislamiento de células acinares pancreáticas en otros grupos de investigación. Con la Colagenasa I y II por separado, se obtuvieron células viables (viabilidad ~ 80%), pero muy poca cantidad para realizar estudios in vitro. Por el contrario, con la colagenasa P se obtuvo un gran número de células, pero a su vez un alto porcentaje de células muertas (viabilidad < 72%) y dichas células no respondieron a estímulo (**fig. 39,A**).

Finalmente se estandarizó el uso de la Colagenasa NB4 de la casa comercial Serva, compuesta por colagenasa I y II, basándonos en el hecho de que con su uso se obtuvieron un mayor número de células en el aislamiento, mayor porcentaje de células vivas y mayor porcentaje de estímulo-respuesta (**fig. 39,B**), poniendo de manifiesto buen estado de los receptores de superficie celular. Por tanto, la colagenasa NB4, que

está indicada para mantener intactos los receptores en células de mamíferos, es la óptima a una concentración de 150 mg/mL (45.4UI) para el aislamiento de células acinares pancreáticas (**fig. 35, 36 Y 37**).

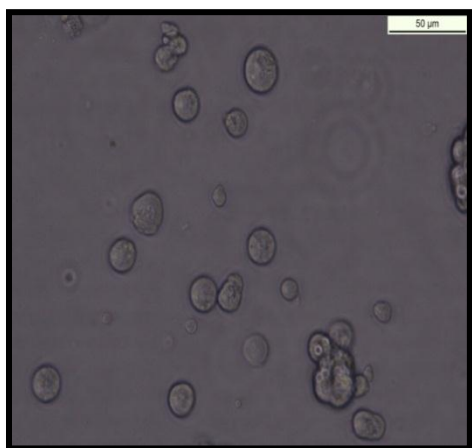


Fig. 35. *Células acinares pancreáticas recién aisladas. Microscopio óptico. 10X*



Fig. 36. *Acino compuesto por tres células con sus gránulos de secreción hacia el polo apical. Microscopio óptico. 20X*

Colagenasa	Centrifugación (RPM)	Centrifugación (tiempo)
Col. I	500	30 s
Col. II	600	1 min
Col. P	700	3 min
Col. NB4	1.000	5 min
	3.000	10 min

Tabla 3. Resumen de las condiciones óptimas para el aislamiento de células acinares pancreáticas.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de aislamiento se testaron la viabilidad y la respuesta de la célula en esas condiciones. Se observó que usando colagenasa ColNB4 a la concentración 45.4U/ml y con unos parámetros de centrifugación de 600 rpm/3min, se obtenía un número medio de células acinares de 4.12×10^5 células/ml ($1.15 \times 10^5 - 20.7 \times 10^5$), con una viabilidad de $77 \% \pm 10.54$ (**fig. 38**) y una respuesta a estímulo de un 90 %.

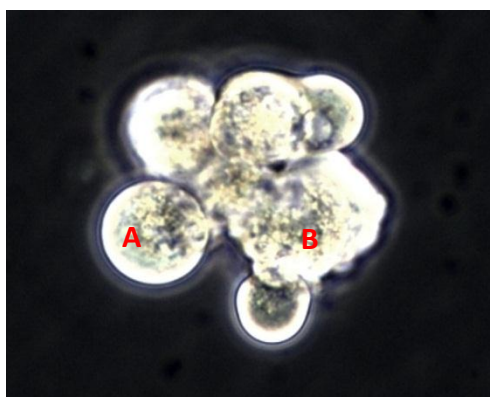


Fig. 38. Células acinares pancreáticas recién aisladas observadas a microscopía óptica. A, célula viva, b, célula muerta.

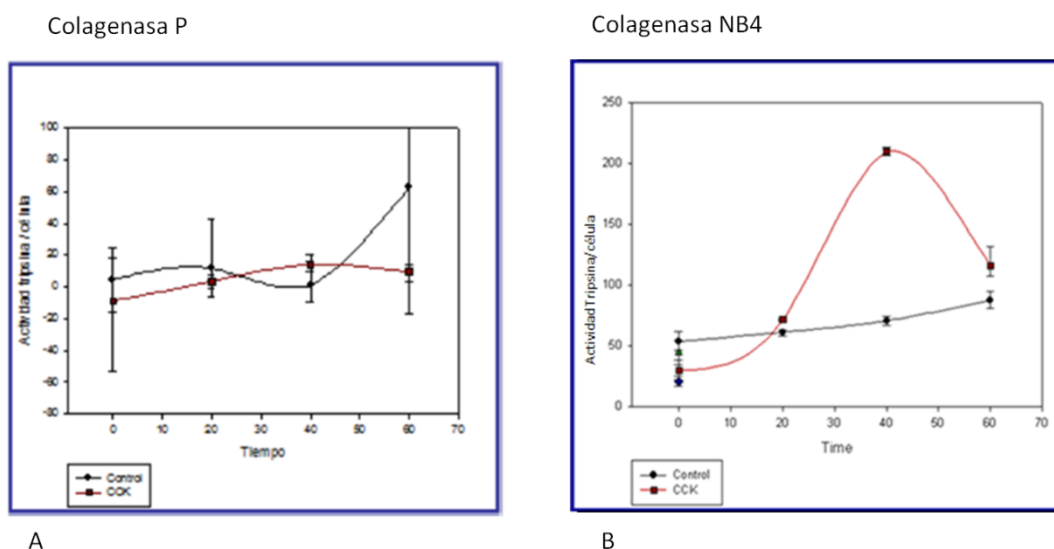


Fig. 39. Respuesta a dosis supramáximas de Colecistokina (100nM) para comprobar la integridad de los receptores celulares, utilizando distintas colagenasas en la degradación enzimática del aislamiento de las células acinares pancreáticas de ratón. A, degradación enzimática con colagenasa P. B, degradación enzimática con colagenasa NB4.

5.2. EFECTO DEL TABACO Y EL ALCOHOL EN LA ACTIVACIÓN INTRACELULAR DE LAS ENZIMAS PANCREÁTICAS

La activación intracelular prematura de zimógenos es uno de los eventos tempranos clave para el desarrollo de las demás alteraciones patológicas asociadas a la pancreatitis crónica.

Para estudiar la asociación de los tóxicos alcohol y tabaco con dicha activación dentro de células acinares pancreáticas, se evaluó la respuesta de la activación intracelular de tripsina, como primera enzima activada. Además de esto, se midió la

activación intracelular de elastasa, como enzima de referencia para evaluar la cascada de activación enzimática producida por la tripsina, frente a distintas concentraciones conocidas de alcohol o tabaco a lo largo de un tiempo determinado. La activación intracelular de estas enzimas pancreáticas se evaluó por fluorimetría.

5.2.1. Activación de tripsina

Solamente se observó incremento de la activación de tripsinógeno a tripsina dentro de la célula en respuesta a dosis supramáximas de la hormona Colecistokinina (100nM), utilizada como control positivo, en el minuto 20 (155.2 ± 19.1 vs 63.0 ± 5.4), 40 (174.6 ± 13.9 vs 85.5 ± 7.9) y 60 (196.2 ± 21.7 vs 91.3 ± 5.5) en comparación con el control negativo (figs. 40, 41).

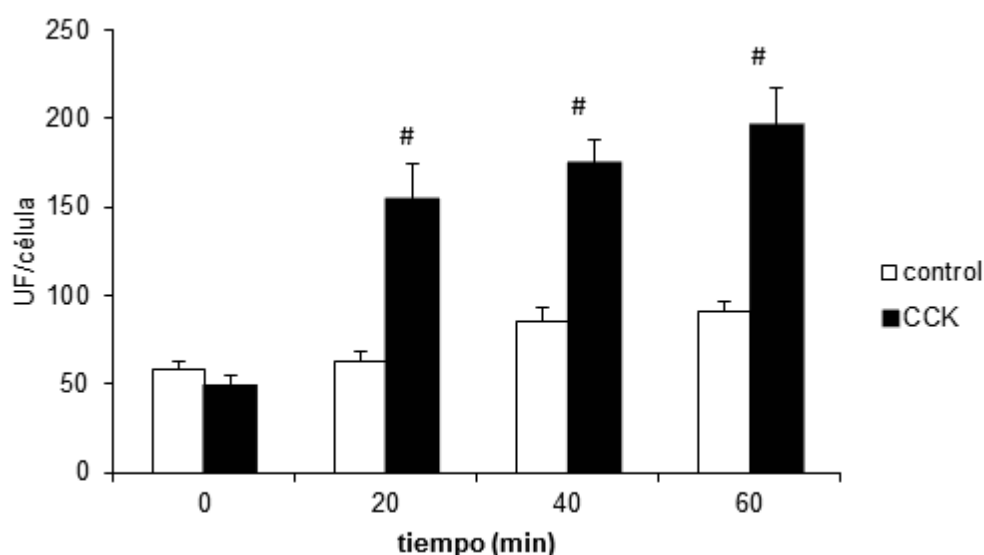


Fig. 40. Emisión de fluorescencia (corregido por número de células viva), sustrato de tripsina + fluorocromo rodamina, emitida en respuesta a CCK 100 nM. # diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

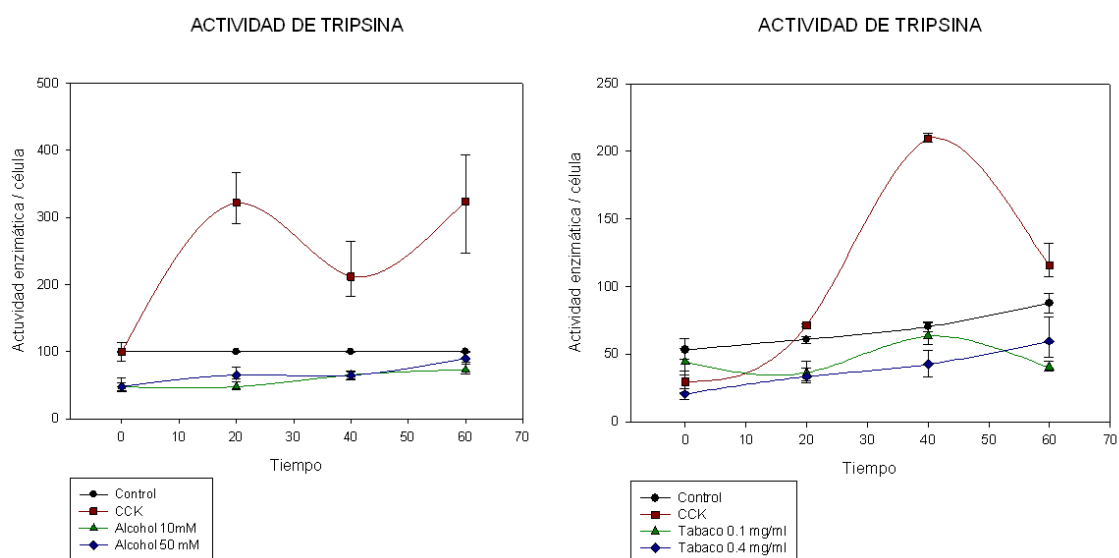


Fig. 41. Registros representativos de dos experimentos aislados donde se observa las medidas de fluorescencia en células acinares pancreáticas de ratón cargadas con (CBZ-Ile-Pro-Arg)2-R110 (substrato de la tripsina) en ausencia de estímulo, estimuladas con CCK (100nM, control positivo) o estimuladas con etanol a dos concentraciones distintas (10 y 50 mM) (fig.A); y estimuladas con dos concentraciones distintas de tabaco (0.1 Y 0.4 mg/ml) (fig. B)

El alcohol no produce ningún efecto sobre la activación enzimática intracelular, no se observó un incremento significativo de la activación intracelular de la tripsina en respuesta a ninguna de las concentraciones evaluadas de alcohol (10-100 nM) a lo largo del tiempo del estudio enzimático (fig. 42).

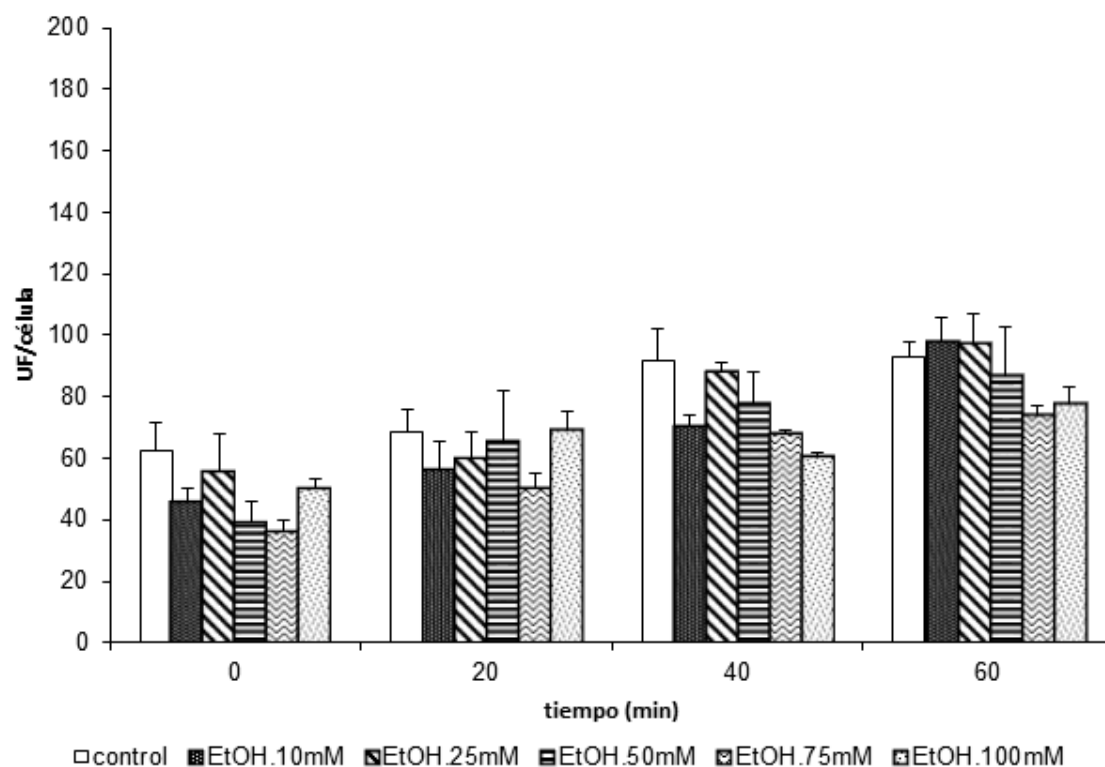


Fig. 42. Emisión de fluorescencia (corregido por número de células viva), sustrato de tripsina + fluorocromo rodamina, emitida en respuesta a distintas concentraciones de etanol (10-100 mM). UF, unidades de fluorescencia.

Tampoco se observa un incremento significativo de la actividad de la tripsina dentro de la célula en respuesta a ninguna de las dosis estudiadas de tabaco (0.001-0.4 mg/ml) (**fig. 43**), si bien se observa una tendencia al incremento en la actividad de tripsina en respuesta a 0.4 mg/ml de tabaco en el minuto 40 (77.6 ± 12.2 vs 111.9 ± 41.2 UF) y en el 60 (88.6 ± 10.5 vs 118.4 ± 24.6 UF), aunque no es estadísticamente significativo.

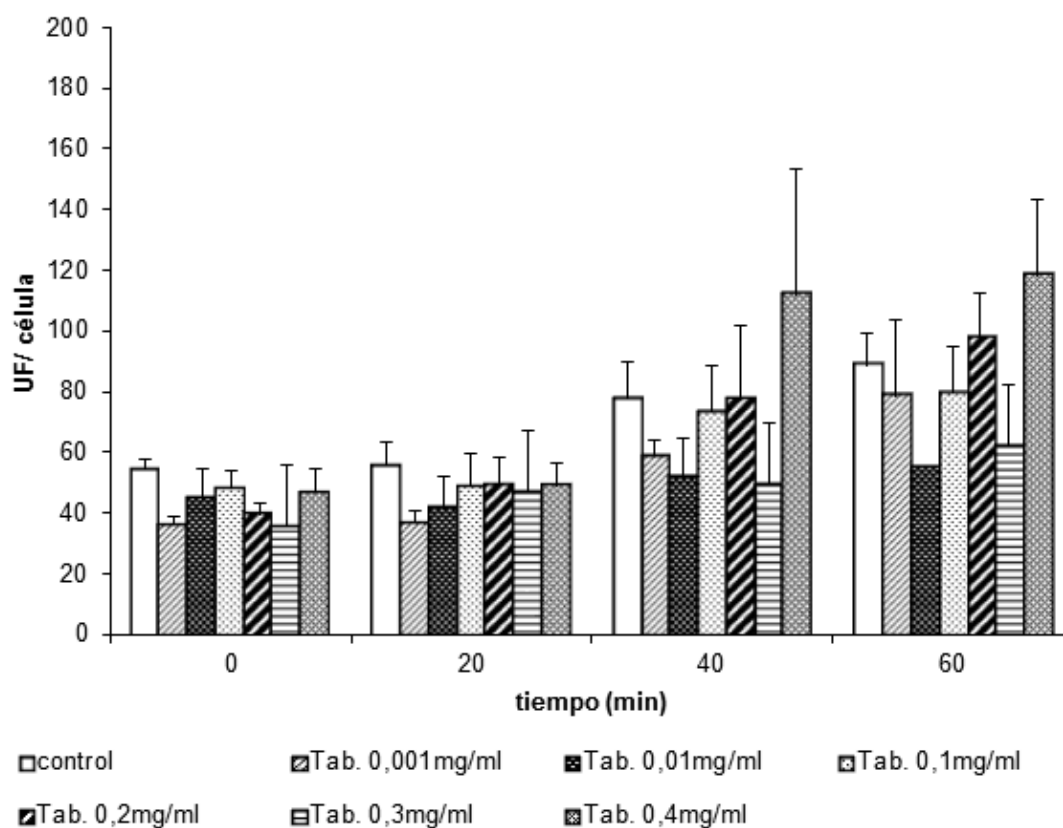


Fig. 43. Emisión de fluorescencia (corregido por número de células viva), sustrato de tripsina + fluorocromo rodamina, emitida en respuesta a distintas concentraciones de tabaco (0.001-0.4 mg/ml). UF, unidades de fluorescencia.

5.2.2. Activación de elastasa

Con respecto a la activación de la elastasa dentro de la célula en respuesta a los tóxicos estudiados, únicamente se observó incremento de dicha activación en respuesta a dosis supramáximas de la hormona Colecistokinina (100 nM) utilizada como control positivo en el minuto 20 (143.5 ± 14.9 vs 75.1 ± 6.9), 40 (164.0 ± 15.1 vs 75.9 ± 6.2) y 60 (178.1 ± 17.8 vs 95.7 ± 9.5) en comparación con el control negativo, correlacionándose dichos resultados con la activación de tripsina (figs. 44, 45).

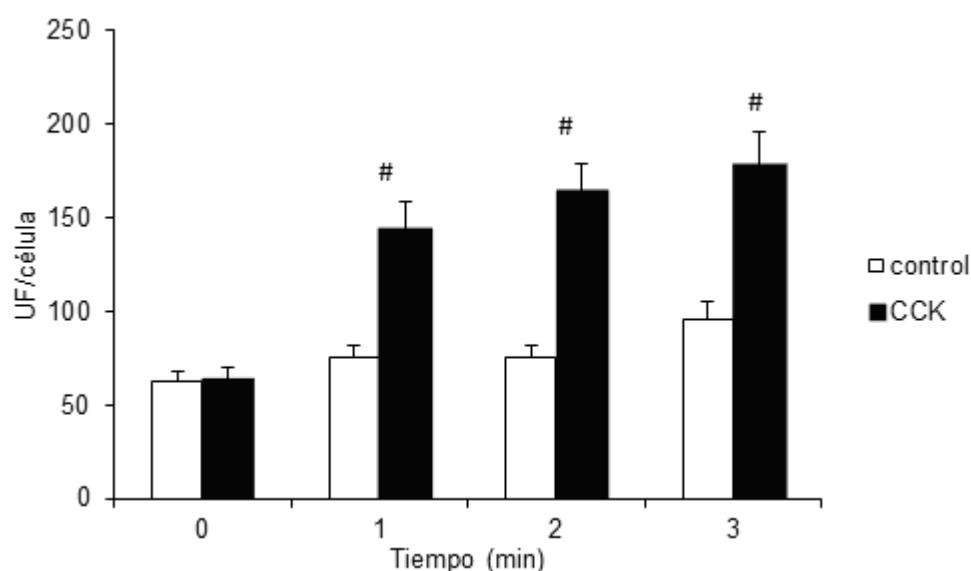


Fig. 44. Emisión de fluorescencia (corregido por número de células viva), sustrato de elastasa + fluorocromo rodamina, emitida en respuesta a CCK 100 nM. # diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

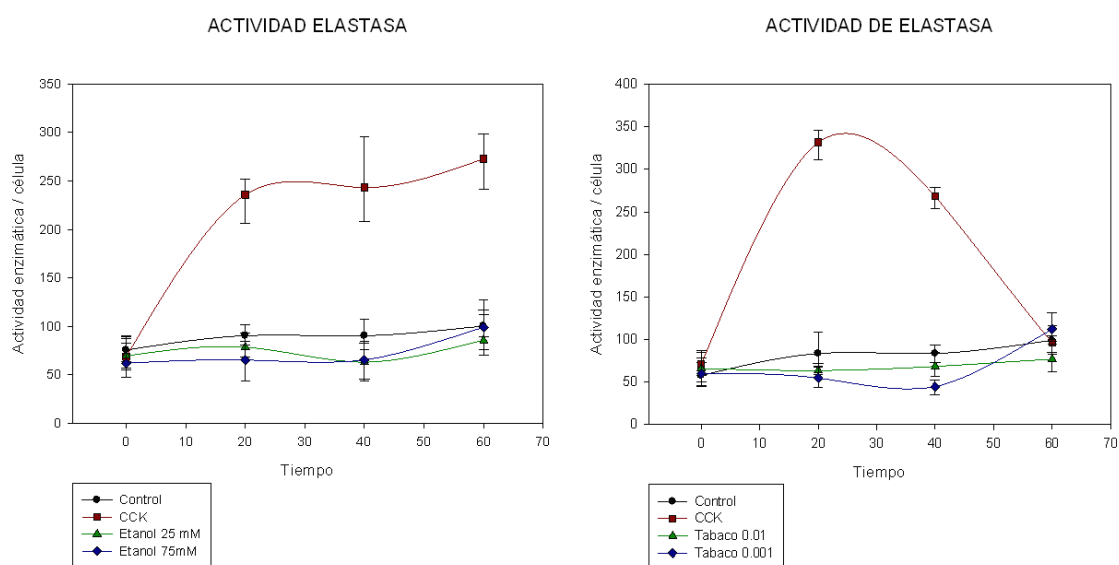


Fig. 45. Registros representativos de las medidas de fluorescencia en células acinares pancreáticas de ratón cargadas con (CBZ-Ala-Ala-Ala-Ala)2-R110 (sustrato de la elastasa) en ausencia de estímulo, estimuladas con CCK (100nM, control positivo) o estimuladas con etanol a dos concentraciones distintas (25 y 75mM) (fig.A); y estimuladas con dos concentraciones distintas de tabaco (0.01 y 0.1 mg/ml) (fig.B).

De la misma manera, también se observó que no se produjo una activación significativa dentro de la célula acinar de proelastasa (forma inactiva) a elastasa (forma activa) frente a ninguna de las concentraciones estudiadas de alcohol (10-100 mM) (**fig. 46**).

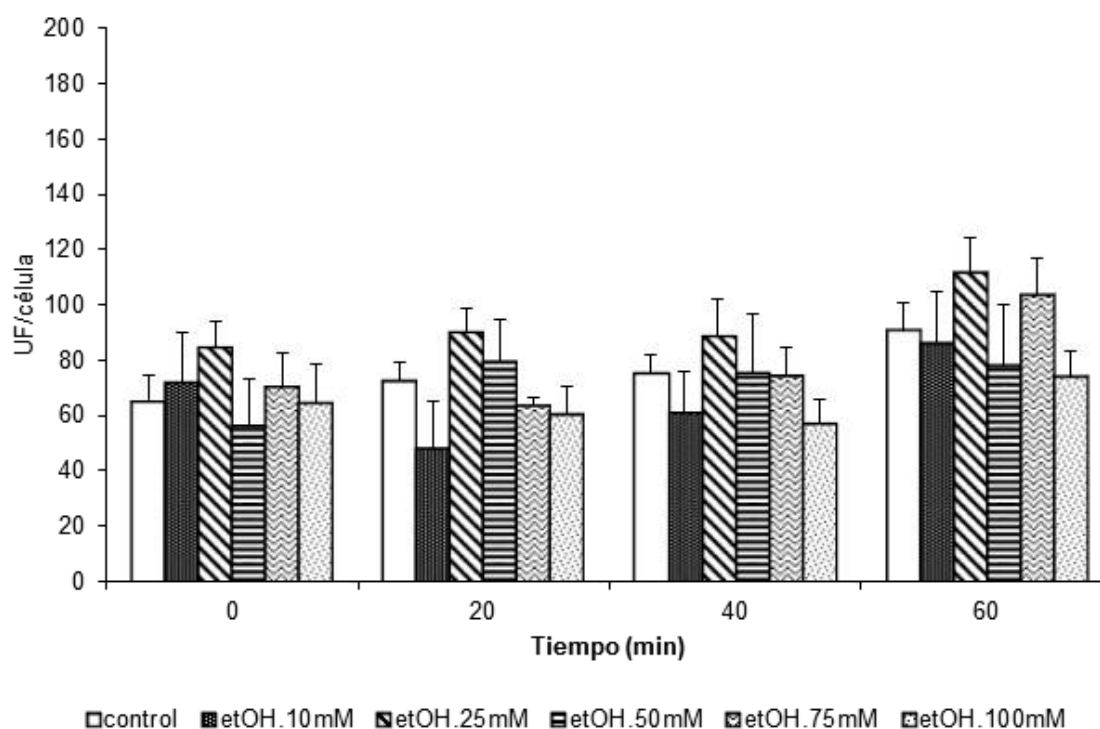


Fig 46. Emisión de fluorescencia (corregido por número de células viva), sustrato de elastasa + fluorocromo rodamina, emitida en respuesta a distintas concentraciones de etano (10-100 mM).

En concordancia con la activación de tripsina, también se concluye que no existe una activación prematura de elastasa dentro de la célula en respuesta a las distintas concentraciones estudiadas de tabaco (0.001-0.4 mg/ml) (**fig. 47**).

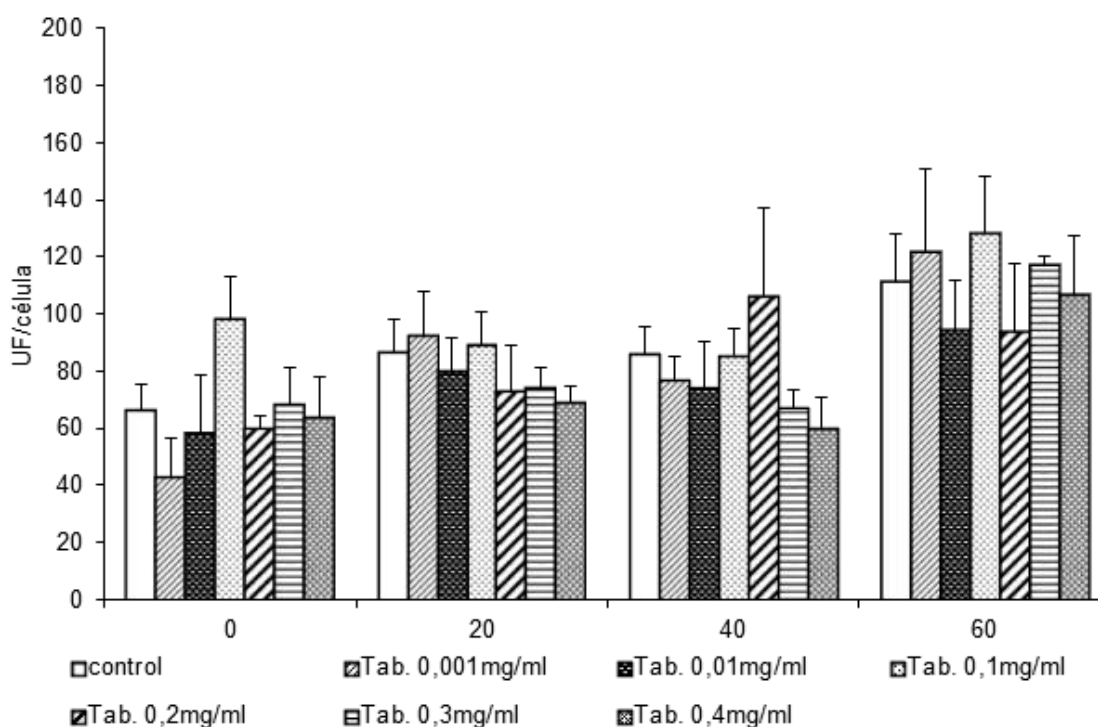


Fig. 47. Emisión de fluorescencia (corregido por número de células viva), sustrato de elastasa + fluorocromo rodamina, emitida en respuesta a distintas concentraciones de tabaco (0.001-0.4 mg/ml).

5.3. ALTERACIÓN DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE CALCIO ($[Ca^{2+}]_c$) EN RESPUESTA AL TABACO Y AL ALCOHOL

La variación de los niveles intracelulares de calcio frente a distintos concentraciones de los tóxicos asociados a daño pancreático, alcohol y tabaco, se evaluó mediante la cuantificación de emisión de fluorescencia, por la sonda Fluo-4 sensible a la concentración de este ión.

Se observó que en respuesta a distintas concentraciones de alcohol, la $[Ca^{2+}]_c$ aumenta de forma significativa de una manera dosis-dependiente en un rango de concentraciones desde 10mM hasta 75 mM (**tabla 4**) (**fig. 48**). El incremento de calcio dentro de la célula, no revierte y se produce de forma mantenida a lo largo del tiempo a estudio como se refleja en el ejemplo en la gráfica 49.

Alcohol		
Negativo	-	- 2.20 ± 0.22
CCK	10 nM	21.73 ± 1.90*
Etanol	10 mM	14.40 ± 2.06*#
	25 mM	34.80 ± 3.99*#
	50 mM	42.60 ± 2.80*#
	75 mM	59.80 ± 2.57*#
	100 mM	23.20 ± 4.39*

Tabla 4. % de incremento de fluorescencia emitida por el fluo-4 en respuesta a distintas concentraciones de alcohol. En la tabla se muestra media ± error típico. *diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) respecto al control negativo. # diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) respecto a la estimulación provocada por CCK.

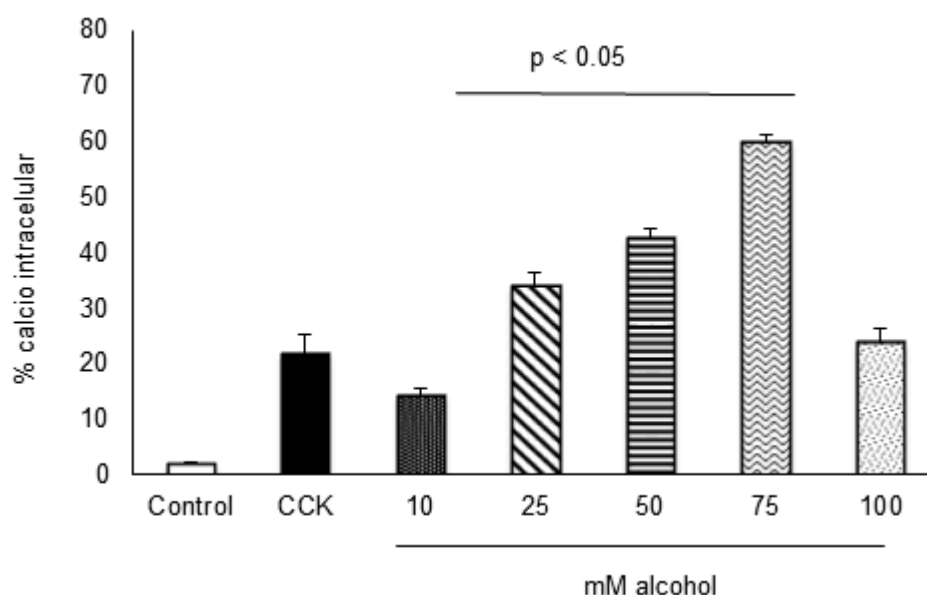


Fig. 48. Incremento de los niveles intracelulares de calcio en células acinares pancreáticas en respuesta a CCK (10nM) y Alcohol (10-100nM), en comparación con el control negativo, evaluado por fluorescencia fluo-4.

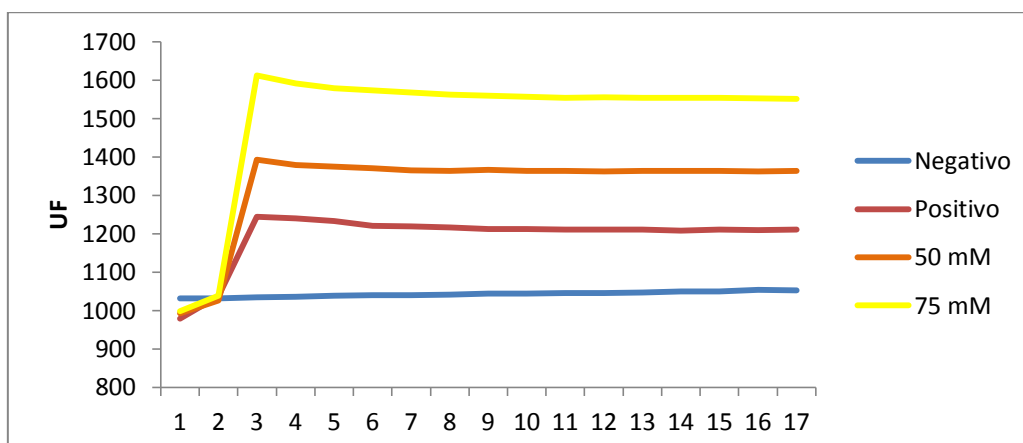


Fig. 49. Registros representativos de las medidas de fluorescencia en células acinares pancreáticas de ratón cargadas con fluo-4 estimuladas con etanol (50, 75 mM), CCK (10 nM; control positivo) o en ausencia de estímulo (control negativo).

Como resultado principal, se demostró que el tabaco produce variaciones intracelulares de calcio. Se encontró un incremento significativo en $[Ca^{2+}]_c$ en respuesta a concentraciones en un rango entre 0.1 y 0.4 mg/ml (tabla 5) de una manera dosis-dependiente y mantenida a lo largo del tiempo (fig. 50).

Tabaco		
Negativo	-	2.83± 0,65
CCK	10 nM	21.13 ± 1.69*
Tabaco	0.001 mg/ml	1.39± 0.15
	0.01 mg/ml	5.92± 01.01
	0.1 mg/ml	15.25± 2.43*#
	0.2 mg/ml	24.43 ± 5.12*#
	0.3 mg/ml	36.16 ± 8.95*#
	0.4 mg/ml	47.11 ± 11.75*#

Tabla 5. % de incremento en respuesta a distintas concentraciones de tabaco. En la tabla se muestra media ± error típico. *diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) respecto al control negativo. # diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) respecto a la estimulación provocada por CCK.

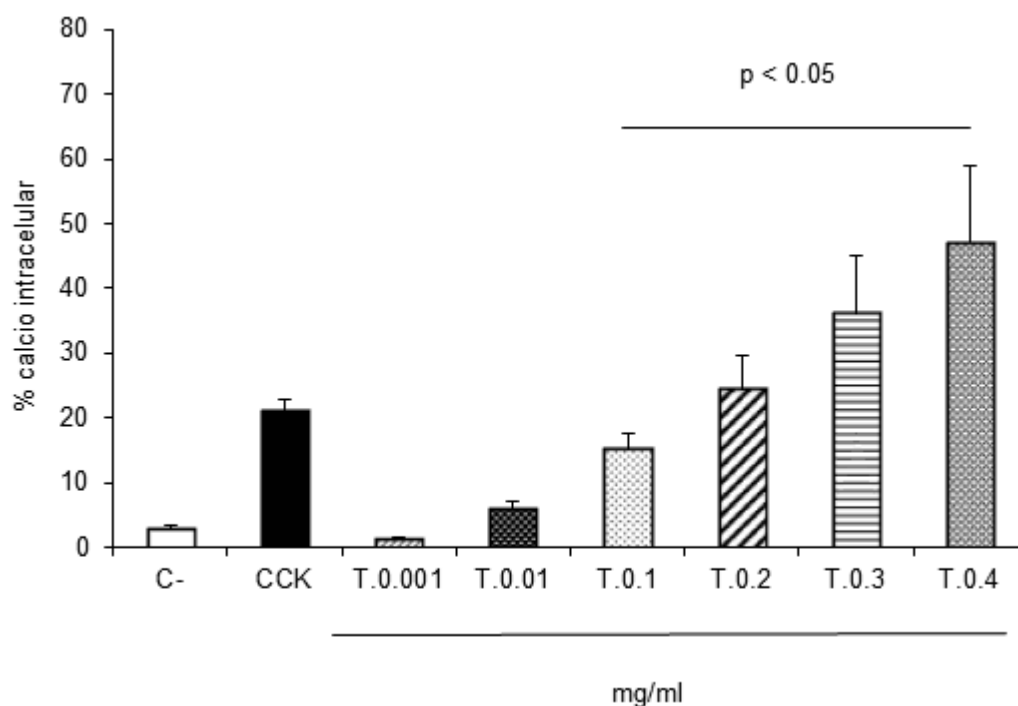


Fig. 50. Incremento de los niveles intracelulares de calcio en células acinares pancreáticas en ausencia de estímulo, en respuesta a CCK (10nM) y a Tabaco (0.001, 0.01, 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 mg/ml), evaluado por fluorescencia fluo-4.

5.4. EFECTO DEL TABACO Y EL ALCOHOL EN LA SECRECIÓN DE ENZIMAS PANCREÁTICAS

Con el objeto de estudiar el efecto del alcohol y del tabaco sobre los mecanismos de secreción de células acinares pancreáticas, tratamos a las células durante las tres horas posteriores a su obtención con distintas concentraciones de dichos tóxicos y medimos la actividad enzimática mediante espectrofotometría.

5.4.1. Secreción de amilasa

En respuesta a dosis supra-máximas de CCK (100 nM) se produce un incremento significativo de la secreción de amilasa a 1 hora (10.91 ± 0.58 vs 16.90 ± 2.57), 2 horas (14.83 ± 1.24 vs 23.58 ± 3.02) y 3 horas (18.41 ± 2.75 vs 30.25 ± 5.33) de incubación de las células acinares pancreáticas con dicho estímulo respecto al control negativo (**fig. 51**).

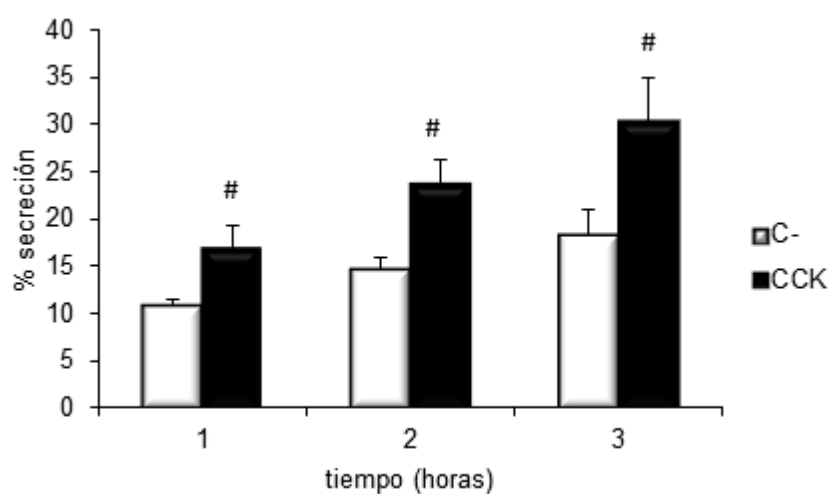


Fig. 51. Porcentaje de secreción de amilasa en respuesta a CCK 100 nM. % de secreción se expresa como $[\text{amilasa extracelular} / \text{amilasa total (int + ext)}] \times 100$. El # indica una asociación estadísticamente significativa de un $p < 0.05$.

Las células acinares pancreáticas no producen un incremento significativo de la secreción de amilasa a ninguno de los tiempos estudiados en respuesta a distintas concentraciones de alcohol, en un rango entre 10 y 100 mM (**fig. 52**).

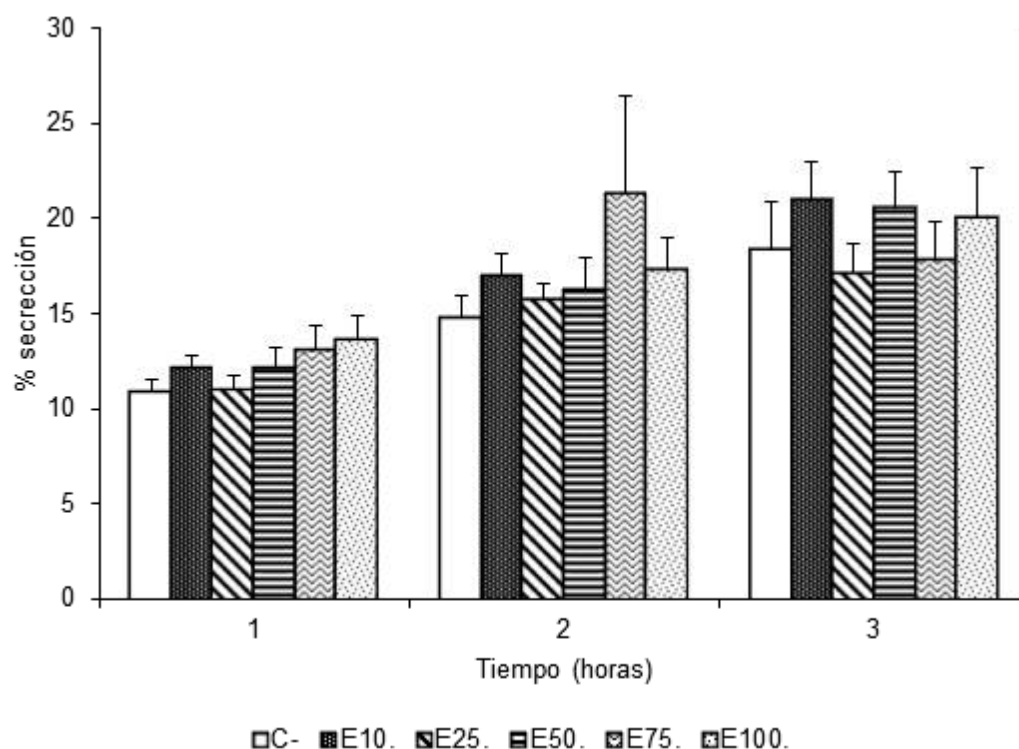


Fig. 52. Porcentaje de secreción de amilasa en respuesta a distintas concentraciones de alcohol a distintos tiempos estudiados. % de secreción se expresa como amilasa extracelular / amilasa total (int + ext) x 100.

Al contrario de lo que ocurre con el alcohol, cuando se estudió la respuesta de la secreción enzimática al tabaco, se observó que se produce un incremento significativo de la secreción de amilasa al cabo de 1 hora en respuesta a 0.3 mg/ml de tabaco ($10.91\% \pm 0.58$ vs $15.63\% \pm 2.40$) y 0.4 mg/ml ($10.91\% \pm 0.58$ vs $14.97\% \pm 2.46$), y a las 2 horas en respuesta a las mismas concentraciones, 0.3 mg/ml ($14.83\% \pm 1.24$ vs $22.94\% \pm 1.1$) y 0.4 mg/ml ($14.83\% \pm 1.24$ vs $23.07\% \pm 4.45$). A las 3 horas existe una clara tendencia al incremento en la secreción de amilasa asociada a concentraciones crecientes de tabaco, sin embargo este incremento es más leve y no es estadísticamente significativo (**fig. 53**).

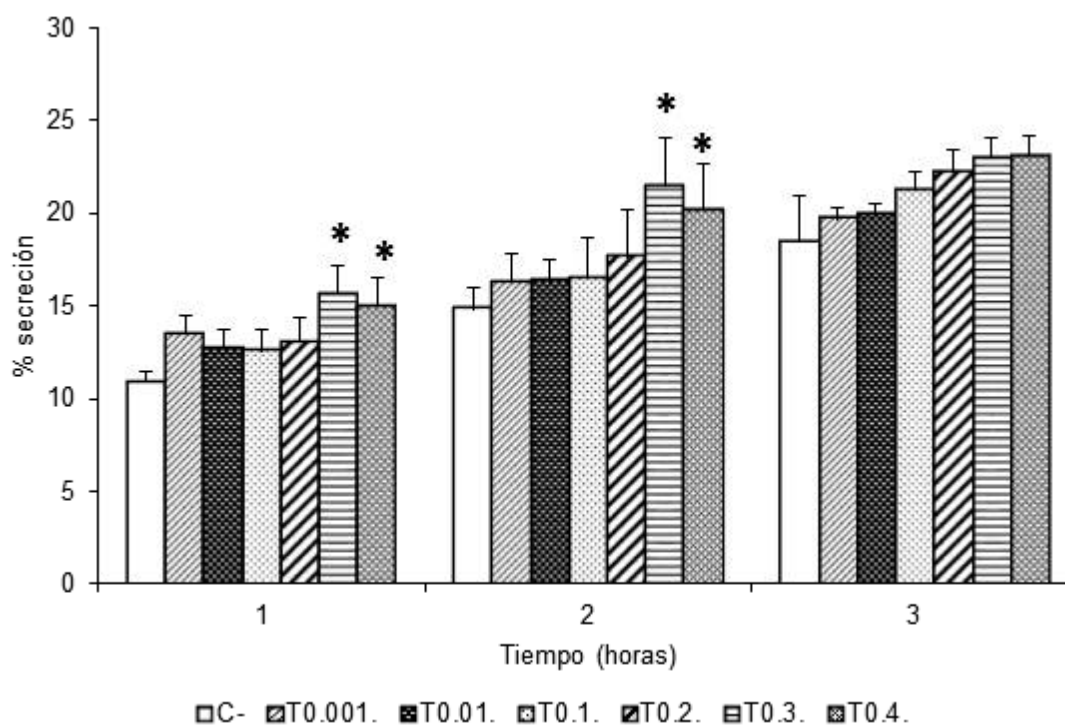


Fig. 53. Porcentaje de secreción de amilasa en respuesta a distintas concentraciones de tabaco a distintos tiempos estudiados. % de secreción se expresa como amilasa extracelular / amilasa total (int + ext) x 100. El * indica una asociación estadísticamente significativa de un p valor de < 0.05.

5.4.2. Secreción de lipasa

Con el fin de comprobar la secreción de enzimas pancreáticas en respuesta a los tóxicos a estudio, nos propusimos estudiar la secreción de lipasa como principal enzima pancreática secretora junto a la amilasa.

De la misma manera que en la secreción de amilasa, comprobamos que la CCK (100 nM) estimula la secreción de lipasa a todos los tiempos testados de incubación (**fig. 54**)

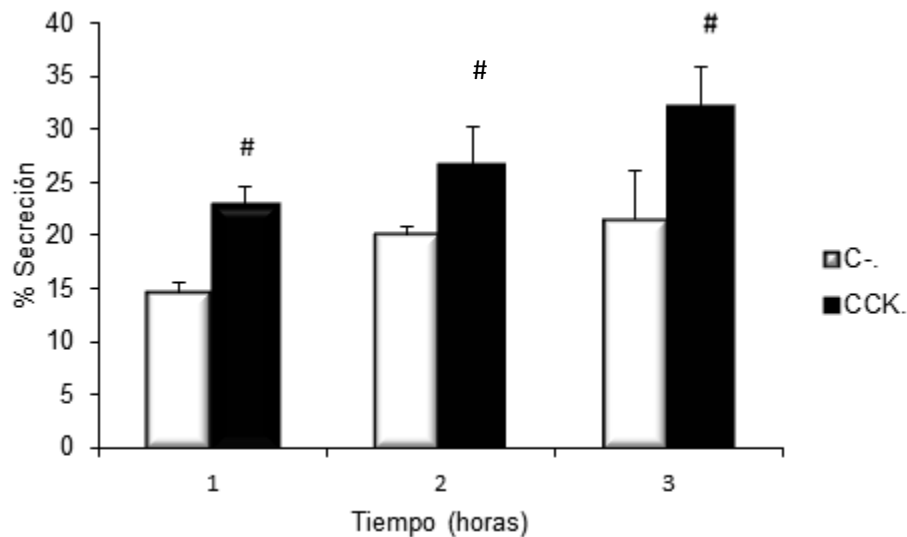


Fig. 54. Porcentaje de secreción de lipasa en respuesta a CCK 100 nM. % de secreción se expresa como $[\text{lipasa extracelular} / \text{lipasa total (int + ext)}] \times 100$. El # indica una asociación estadísticamente significativa de un $p < 0.05$.

Al evaluar la secreción de lipasa en respuesta a distintas concentraciones de alcohol, encontramos que no se produce ningún efecto (**fig. 55**), sin embargo, sí que se produce un incremento de la secreción de lipasa en respuesta a dosis de 0.2, 0.3 y 0.4 mg/ml de tabaco a las 2 y 3 horas de incubación (**fig. 56**), aunque no estadísticamente significativo, lo que corrobora la alteración producida en la secreción de amilasa en respuesta al tabaco.

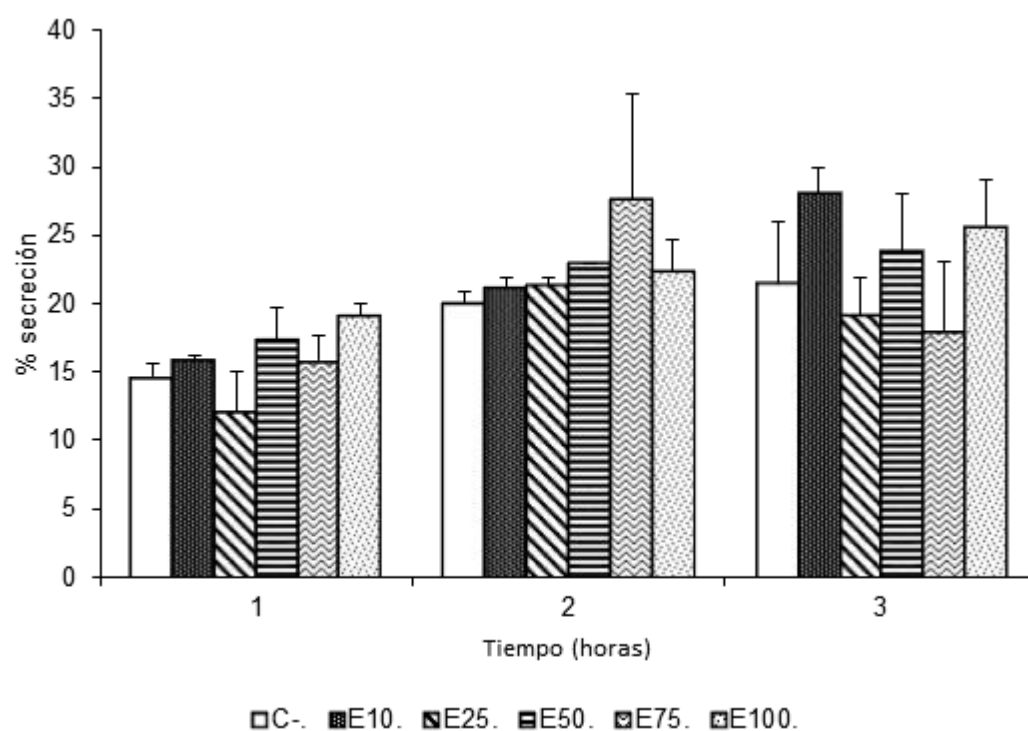


Fig. 55. Porcentaje de secreción de lipasa en respuesta a distintas concentraciones de alcohol a distintos tiempos estudiados. % de secreción se expresa como lipasa extracelular / lipasa total (int + ext) x 100.

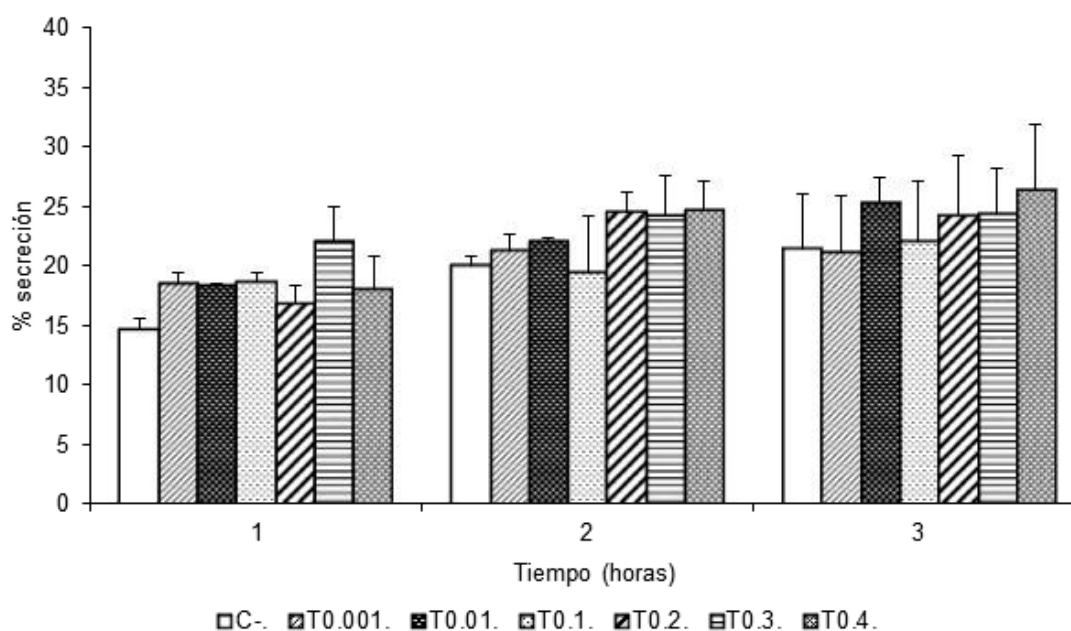


Fig. 56. Porcentaje de secreción de lipasa en respuesta a distintas concentraciones de tabaco a distintos tiempos estudiados. % de secreción se expresa como lipasa extracelular / amilasa total (int + ext) x 100.

5.5. EFECTO DEL TABACO Y DEL ALCOHOL EN EL DESARROLLO DEL PROCESO INFLAMATORIO

Por definición, el desencadenamiento del proceso inflamatorio es el evento central asociado a la pancreatitis crónica. Con la finalidad de estudiar dicho proceso en respuesta a alcohol o a tabaco en células acinares pancreáticas, se evaluó la translocación al núcleo de la proteína de señalización NFkappaB y la secreción de Il1beta por parte de dichas células.

5.5.1. Activación de NFkappaB

Se confirma un incremento, aunque no significativo, en respuesta a dosis supramáximas de CCK (100 nM) (**fig. 57**), utilizado como control positivo.

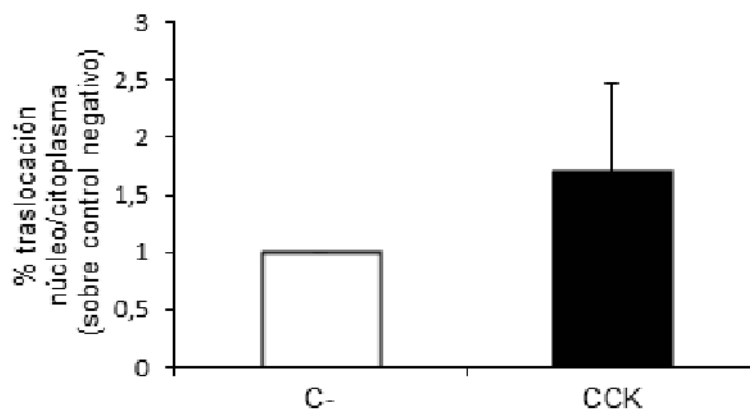


Fig. 57. Incremento de la presencia de p65 en el núcleo en relación con el citoplasma en respuesta a CCK 100nM, comparado con el control negativo (C-) y evaluado mediante densitometría de Western Blot.

En relación a la traslocación de la subunidad p65 de NFkappaB desde el citoplasma al núcleo celular, que va a tener función de factor de transcripción, los datos muestran que no se produce un incremento significativo de dicha traslocación en respuesta a distintas dosis de alcohol (10-100 mM) (**figs. 58, 59**).

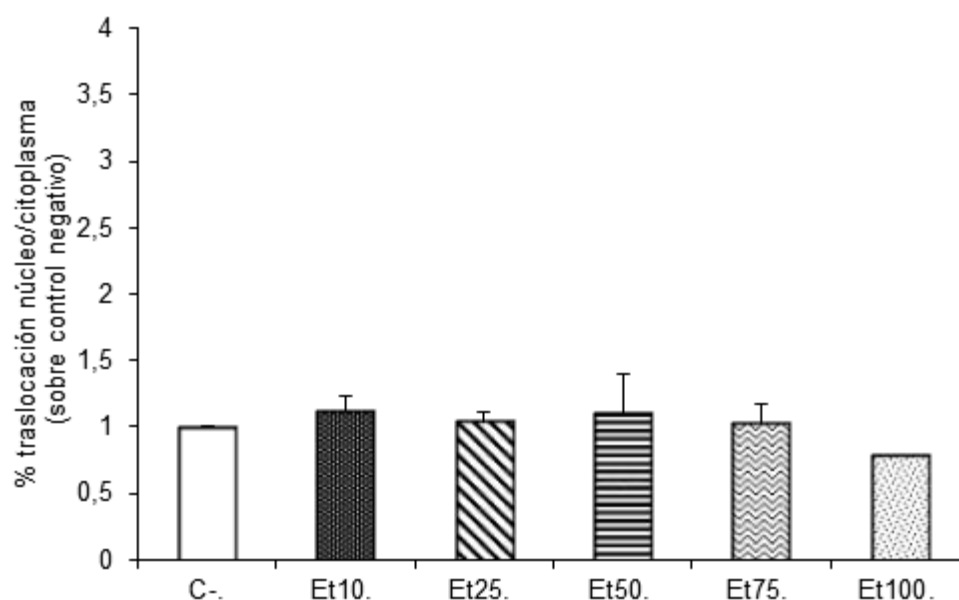


Fig. 58. Incremento de la presencia de p65 en el núcleo en relación con el citoplasma, comparado con el control negativo y evaluado mediante densitometría de Western Blot frente a distintas concentraciones de alcohol.

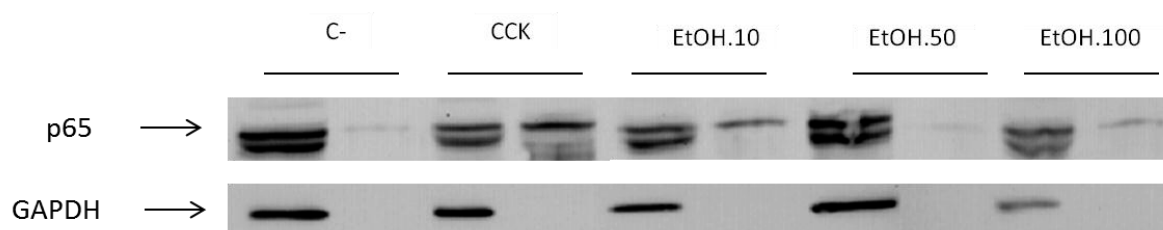


Fig. 59. Western blot p65 Y GAPDH. Imagen representativa expresión de p65 en citoplasma y núcleo en los distintos casos en respuesta a CCK (100nM) y distintas dosis de alcohol (10-100mM).

Respecto al efecto de distintas concentraciones de tabaco en la activación de la subunidad p65 de NFkappaB, los datos muestran que se produce un incremento significativo 2.5 veces mayor respecto al control negativo en respuesta a dosis de 0.1

mg/ml (figs. 60, 61) y a 3 horas tras la estimulación de las células acinares pancreáticas.

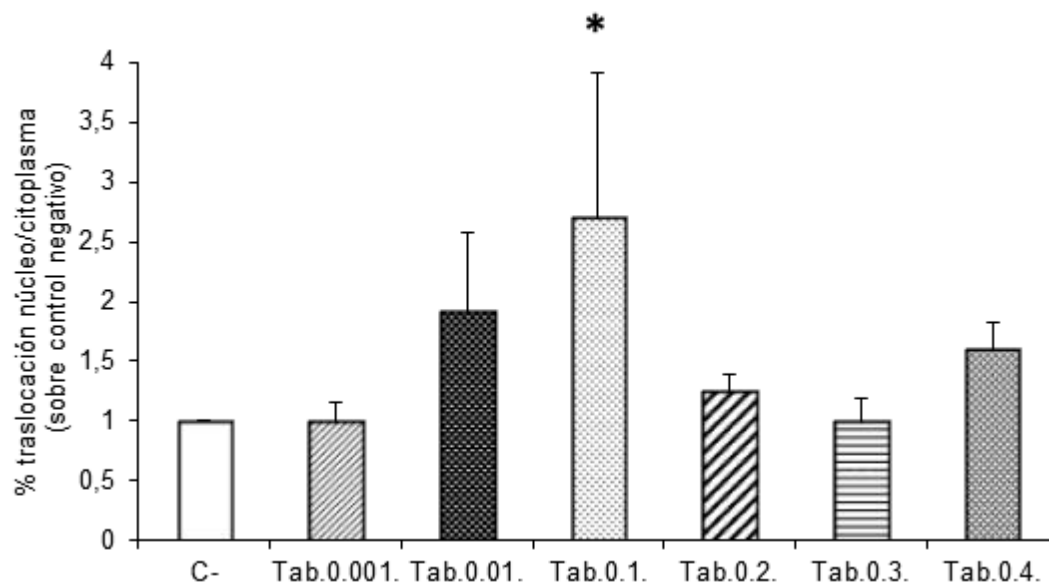


Fig. 60. Incremento de la presencia de p65 en el núcleo en relación con el citoplasma, comparado con el control negativo y evaluado mediante densitometría de Western Blot frente a distintas concentraciones de tabaco. * $p < 0.05$

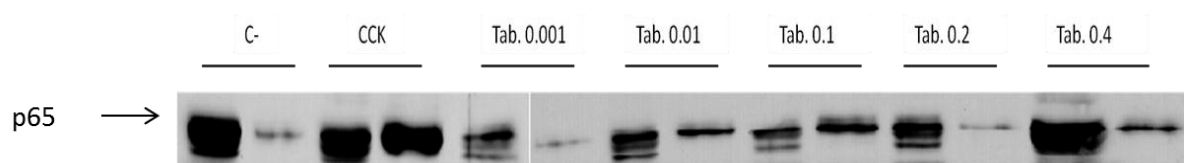


Fig. 61. Western blot p65 Y GAPDH. Imagen representativa, expresión de p65 en citoplasma y núcleo en los distintos casos en respuesta a CCK (100nM) y distintas dosis de tabaco (0.001-0.4 mg/ml).

5.5.2. Secreción de Interleukina 1 beta

En células acinares pancreáticas de ratón no se ha observado un incremento de la secreción de Il 1 beta en respuesta a 100nM de CCK a las 3 horas de incubación con el estímulo (**fig. 62**)

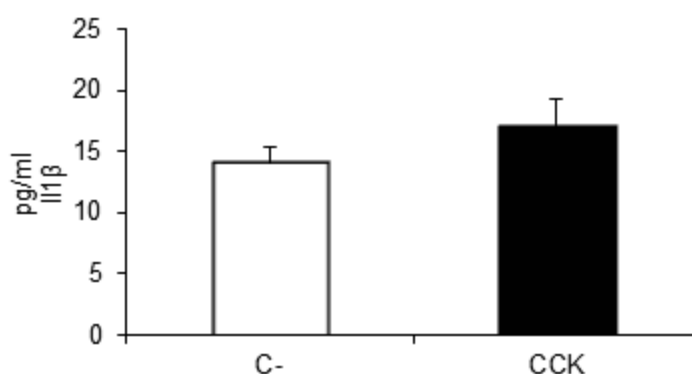


Fig. 62. Concentración de la secreción Interleukina 1 beta en ausencia de estímulo (C-) y en respuesta a CCK 100 nM.

En el presente trabajo se encontró que ninguna de las concentraciones de alcohol estudiadas produce un incremento de la secreción de la interleukina 1 beta. La secreción es mínima tanto en células no estimuladas, secreción mínima 14.1 pg/ml, como en las células estimuladas con los distintos probandos, con una secreción máxima 23.84 pg/ml en respuesta a 100 mM de alcohol (**fig. 63**).

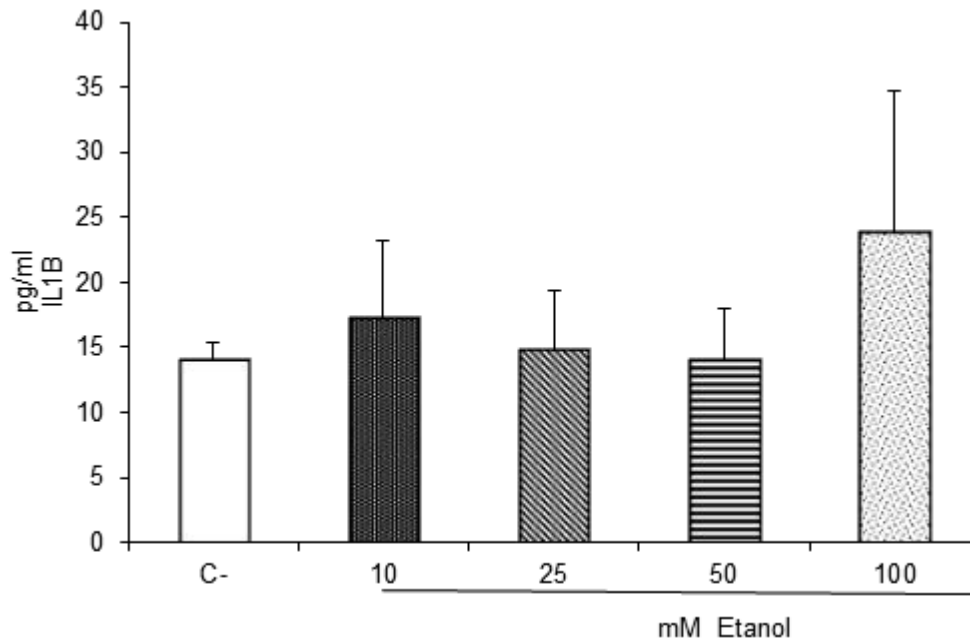


Fig. 63. Concentración de la secreción Interleukina 1 beta en ausencia de estímulo y frente a distintas concentraciones de alcohol (10-100nM).

De la misma manera, tampoco se produjo un incremento significativo de la producción de interleukina 1 beta por parte de la célula acinar en respuesta a ninguna de las concentraciones de tabaco estudiadas, siendo la secreción mínima de 14.1 pg/ml (control negativo) y la secreción máxima de 20.1 pg/ml en respuesta a 0.1 mg/ml de tabaco (**fig. 64**). Dosis de 0.3 mg/ml y 0.4 mg/ml de tabaco no produjeron niveles detectables de interleukina 1 beta.

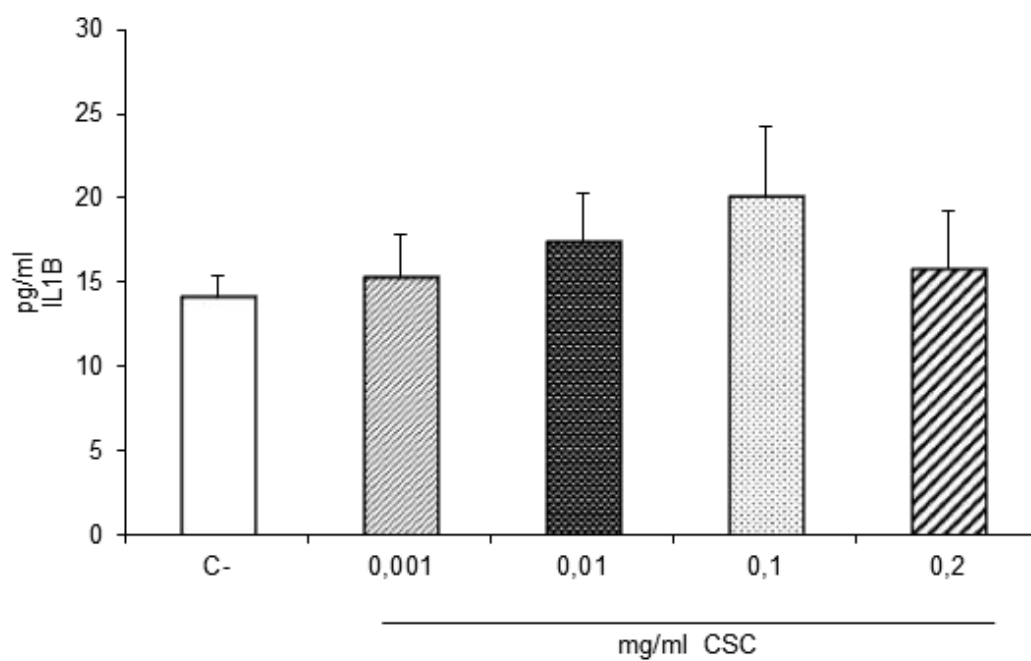


Fig. 64. Concentración de la secreción Interleukina 1 beta en ausencia de estímulo, en respuesta a CCK y frente a distintas concentraciones de tabaco.

5.6. ESTRÉS CELULAR EN RESPUESTA AL TABACO Y AL ALCOHOL: PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

Con el objetivo de evaluar si los agentes tóxicos como el alcohol o el tabaco desencadenan la producción de especies reactivas del oxígeno, en el presente trabajo se estimularon las células acinares pancreáticas con estos tóxicos durante distintos intervalos de tiempo y se cuantifica por emisión de fluorescencia.

Después de estimular las células con concentraciones de 10, 25, 50, 75 y 100 mM de alcohol, se ha observado que ninguna de las concentraciones estudiadas afecta a la producción de especies reactivas del oxígeno en la célula acinar pancreática en ninguno de los tiempos de incubación (**fig. 65**).

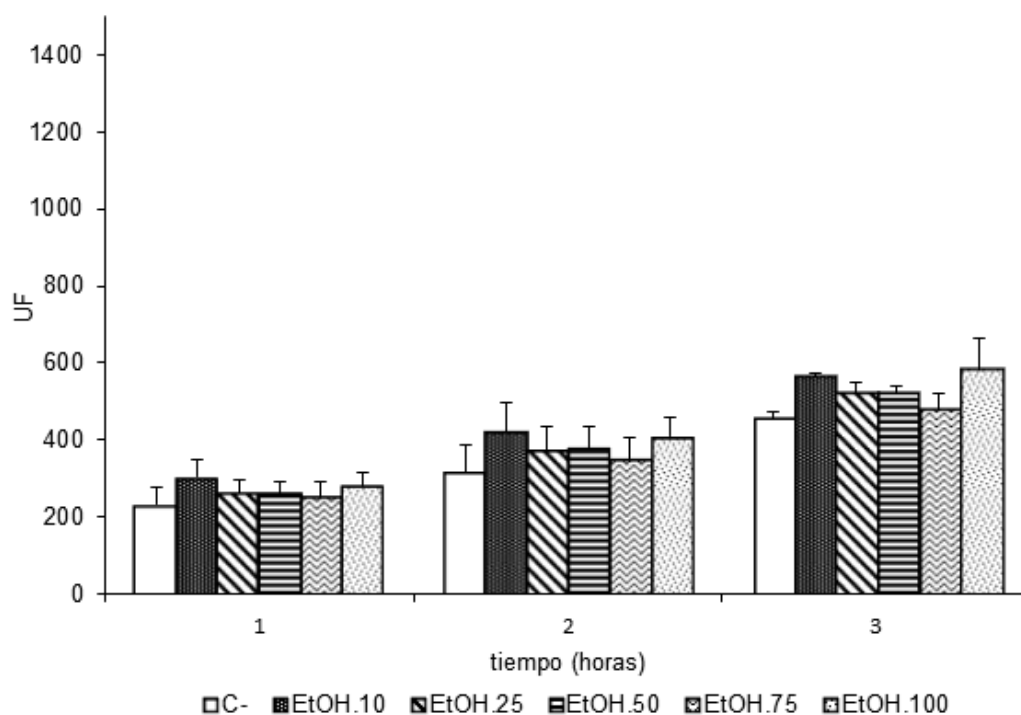


Fig. 65. Producción de especies reactivas del oxígeno en célula acinar pancreática en respuesta a alcohol, evaluado por emisión de unidades de fluorescencia a 1, 2 y 3 h.

En el caso del efecto del tabaco en la producción de especies reactivas del oxígeno, se observó que desde la primera hora de estimulación con dosis altas de tabaco se producía un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno. A las 3 horas de estimulación a concentraciones altas de tabaco, 0.2 (854.4 UF \pm 222), 0.3 (1235.8 UF \pm 311.7) y 0.4 mg/ml (1270.4 UF \pm 406.7) la producción de dichas moléculas se incrementaban de forma estadísticamente significativa con respecto al control negativo (**fig. 66**). Este hecho se observó también por microscopia de fluorescencia (**fig. 67**).

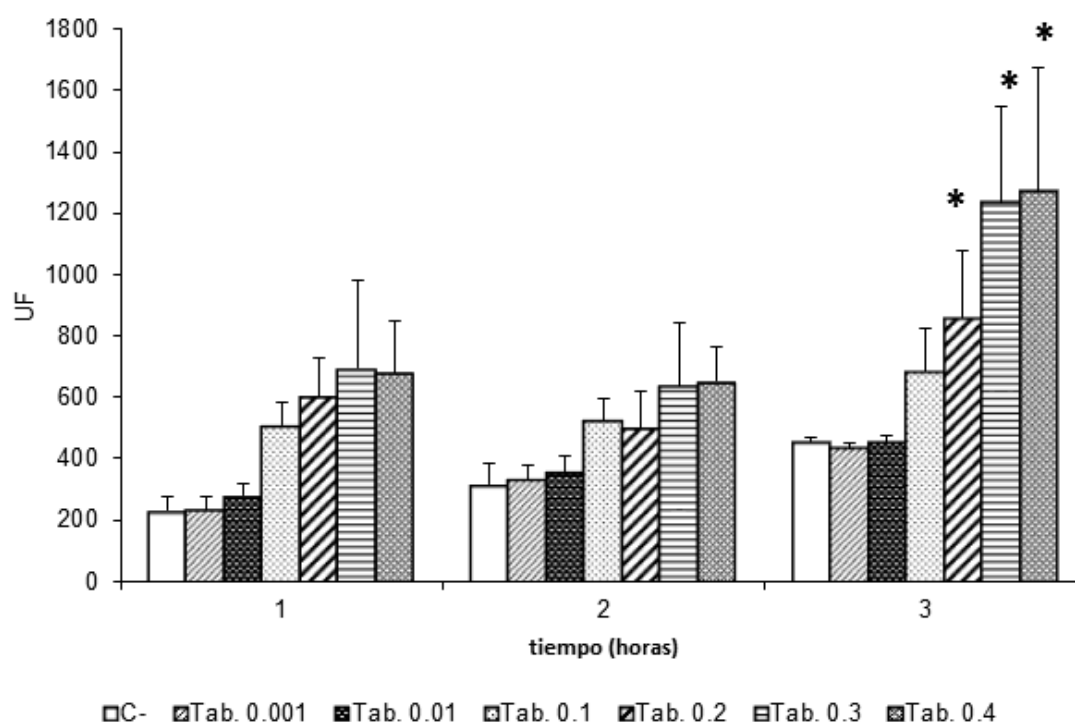


Fig. 66. Producción de especies reactivas del oxígeno en célula acinar pancreática en respuesta a tabaco, evaluado por emisión de unidades de fluorescencia a 1, 2 y 3 h. *diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) respecto al control negativo. * $p < 0.05$

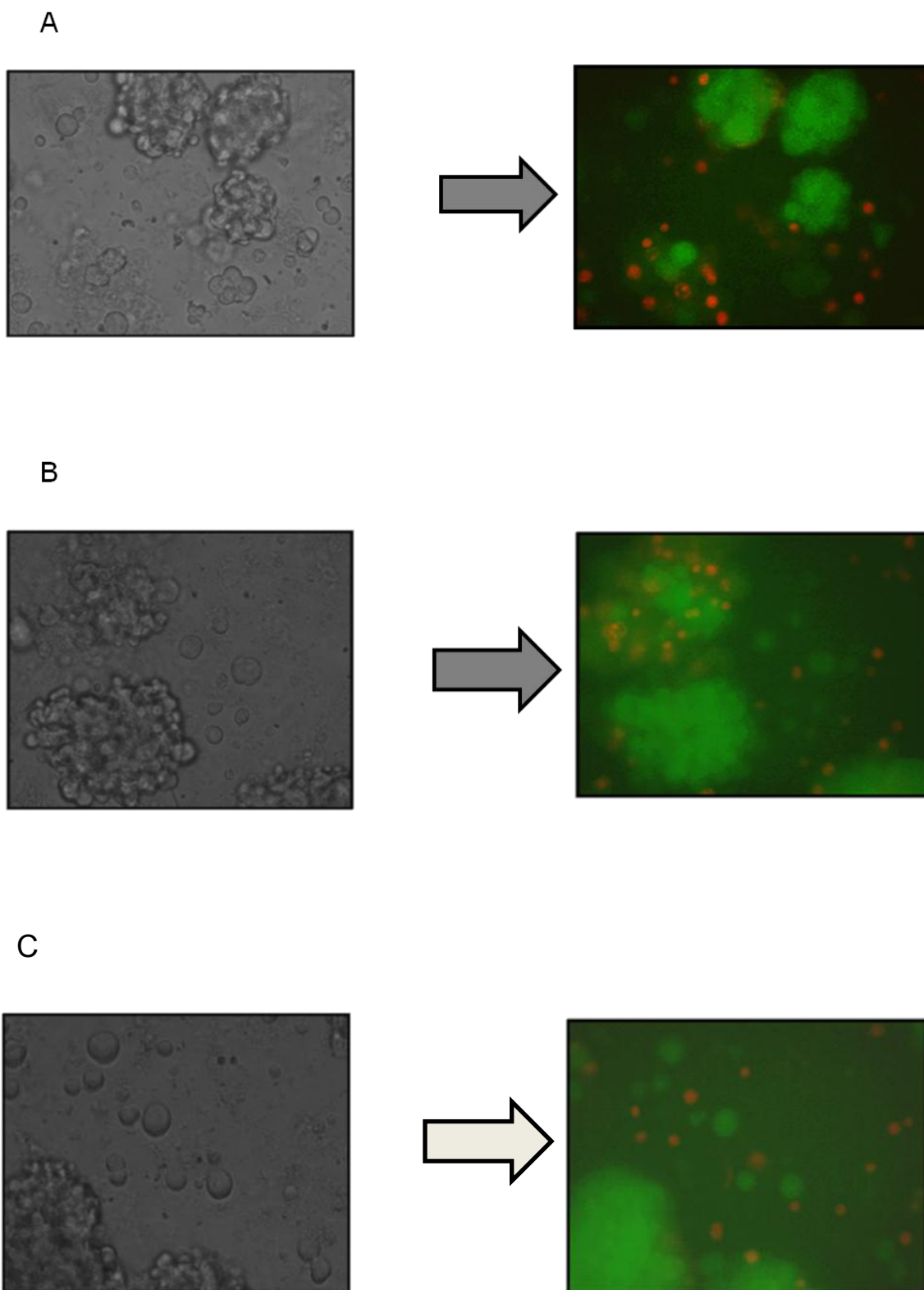


Fig. 67. Registro representativo de la emisión de flurescencia por microscopia de fluorescencia en respuesta a dosis de 0.2 mg/ml (A), 0.3 mg/ml (B) y 0.4 mg/ml (C). Fluorescencia verde, fluorocromo HDCFDA; fluorescencia roja, ioduro de propidio.

Cabe destacar también, que la Colecistokinina a dosis supramáximas (100 nM), las cuales se proponen como dosis que reproducen eventos de pancreatitis crónica *in vitro*, no producen un incremento significativo de la producción de especies reactivas del oxígeno a ninguno de los tiempos estudiados (**fig. 68**).

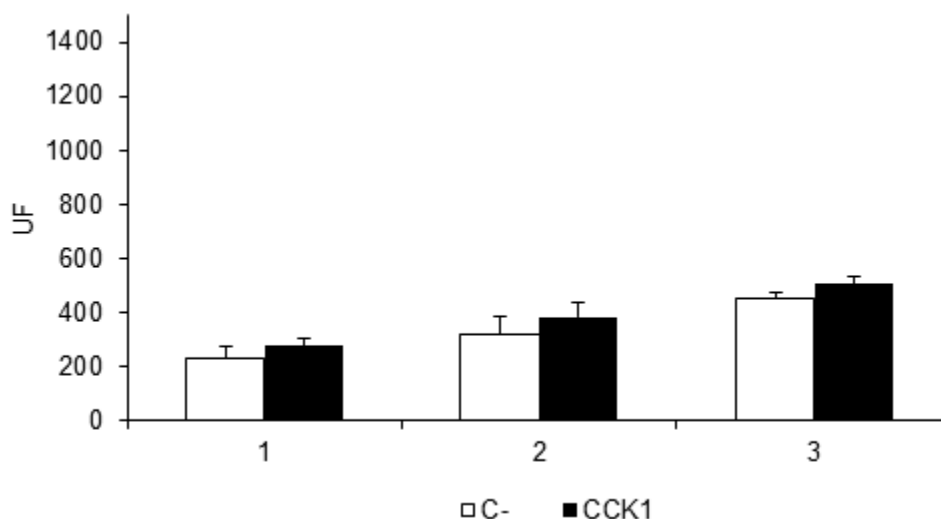


Fig. 68. Producción de especies reactivas del oxígeno en célula acinar pancreática en respuesta a CCK, evaluado por emisión de unidades de fluorescencia a 1, 2 y 3 h.

5.7. MUERTE CELULAR EN RESPUESTA AL TABACO Y AL ALCOHOL

La muerte celular se produce en la pancreatitis crónica debido a autodigestión de proteasas pancreáticas, al efecto de las especies reactivas del oxígeno o al efecto del proceso inflamatorio. Con el fin de observar si los agentes tóxicos alcohol o tabaco inducen fenómenos de muerte celular, se estudió el intercalamiento del yoduro de propidio en el ADN celular, indicación de muerte celular por necrosis, la producción de

lactato deshidrogenasa que indican rotura de la célula y muerte por necrosis y la activación de la caspasa 3, indicadora de fenómenos de apoptosis.

5.7.1. Necrosis celular

Se realizó el análisis del ioduro de propidio mediante fluorescencia en células acinares pancreáticas en respuesta a dosis de 10, 25, 50, 75 y 100 mM de alcohol encontrándose que no había efecto sobre la necrosis celular a ningún tiempo estudiado (fig. 69).

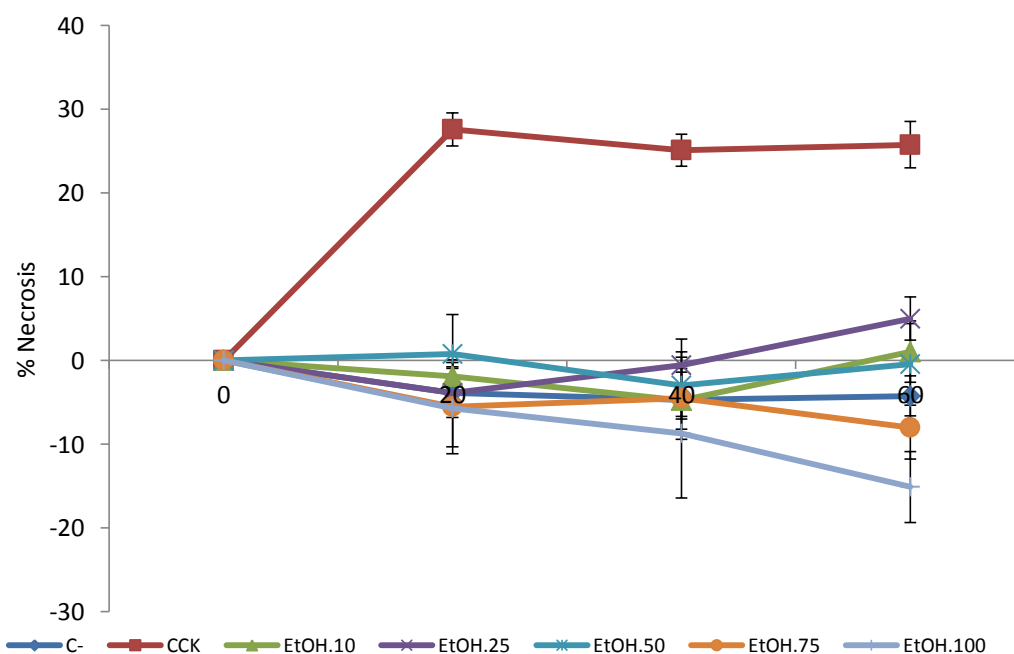


Fig. 69. Necrosis celular, en respuesta a distintas dosis de alcohol, evaluada por intercalamiento de ioduro de propidio mediante fluorescencia. Expresado como % necrosis.

A diferencia de lo que ocurre con el alcohol, en respuesta a distintas dosis altas de tabaco se produce un incremento significativo del porcentaje de necrosis celular. El tabaco en 0,3 y 0,4 mg/ml induce una necrosis celular del 14.3% y 19.4%, respectivamente, después de 60 minutos ($p < 0,05$ comparado con el control negativo), similar a la obtenida por la dosis supramáximas de CCK (**fig. 70**).

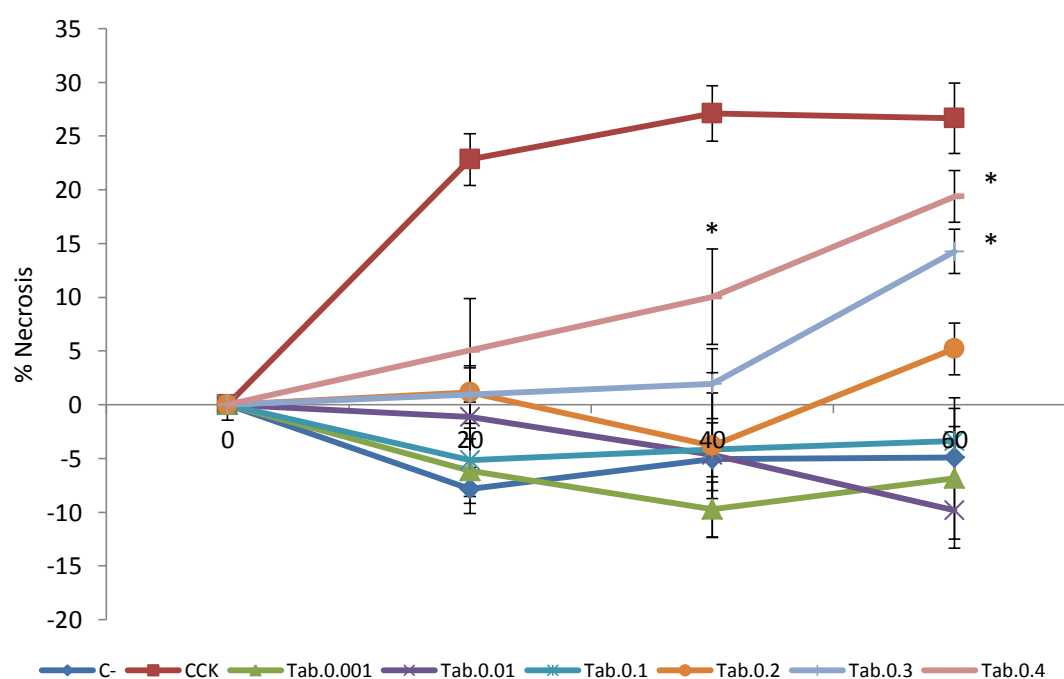


Fig. 70. Necrosis celular, en respuesta a distintas dosis de tabaco, evaluada por intercalamiento de yoduro de propidio mediante fluorescencia. Expresado como % necrosis. El * indica una significación estadística de $p < 0.05$.

5.7.2. Producción de lactato deshidrogenasa

Los presentes datos demuestran que no se produce un incremento de la producción de lactato deshidrogenasa a ninguna de las concentraciones estudiadas de alcohol en comparación con el control negativo (**fig. 71**).

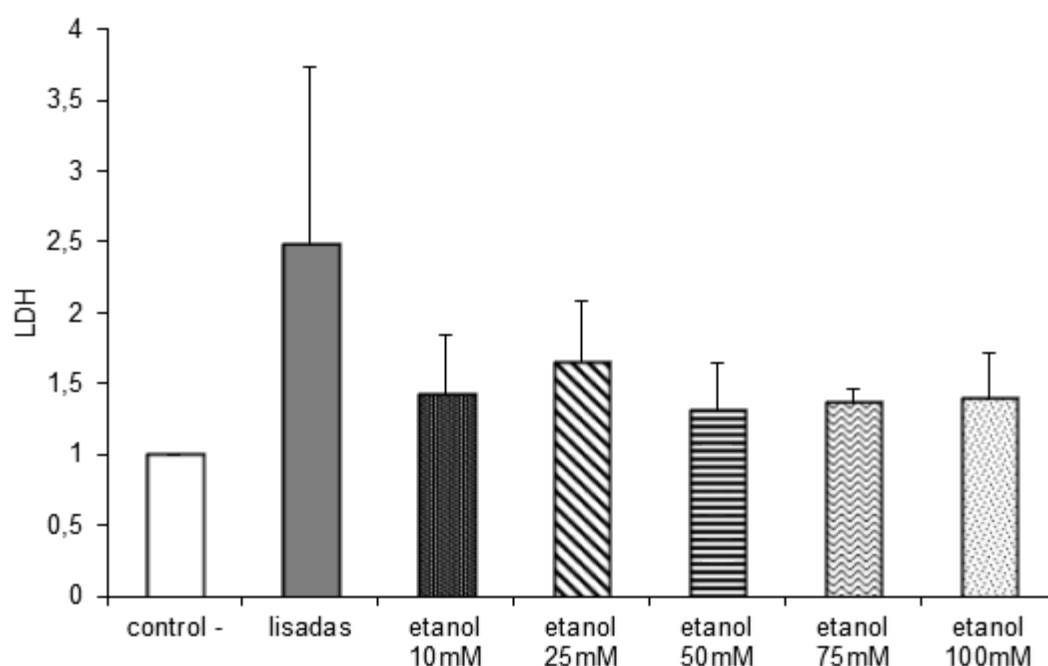


Fig. 71. Incremento de la citotoxicidad celular con respecto al control negativo en respuesta a distintas concentraciones de alcohol, evaluado por la producción de lactato deshidrogenasa.

En concordancia con la detección de necrosis celular evaluada mediante ioduro de propidio, se observó se incrementa la producción de lactato deshidrogenasa en respuesta a dosis altas de tabaco. En respuesta a dosis de 0.2 mg/ml se produce una citotoxicidad 1.83 veces más alta que el control negativo; en el caso de dosis de 0.3 mg/ml, 1.82 sobre el control negativo; y en respuesta a 0.4 mg/ml, 1.98 (**fig. 72**).

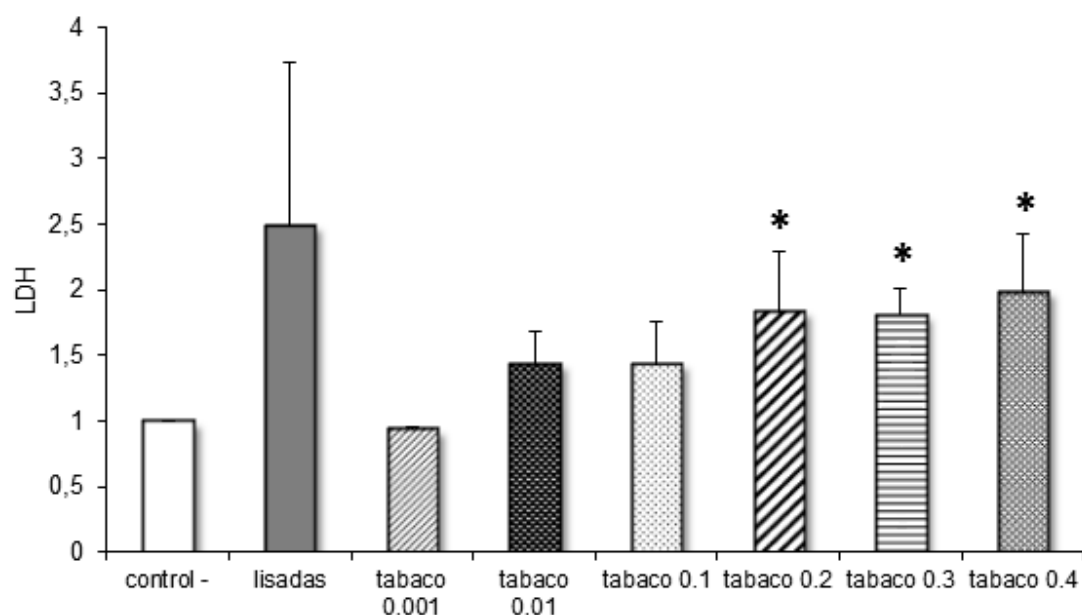


Fig. 72. Incremento de la citotoxicidad celular con respecto al control negativo en respuesta a distintas concentraciones de tabaco, evaluado por la producción de lactato deshidrogenasa. El * indica una significación estadística de $p < 0.05$.

5.7.3. Apoptosis: activación de caspasa 3

La apoptosis en células acinares pancreáticas en respuesta a distintos tóxicos se evaluó por la activación de caspasa 3, proteína central en la ruta de señalización intracelular apoptótica.

En primer lugar, comprobamos que la CCK, utilizada como control positivo, a dosis de 100 nM, induce la apoptosis por activación de caspasa 3 en el citoplasma celular (figs. 73, 74), aunque las diferencias numéricas no son estadísticamente significativas debido a la variabilidad del densitometraje.

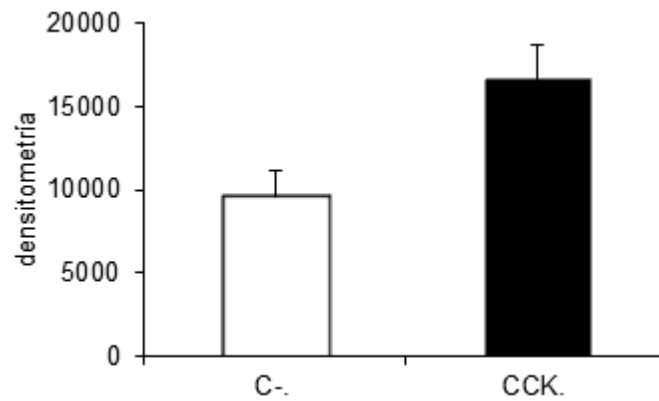


Fig. 73. Activación de caspasa 3 en el citoplasma de la célula acinar evaluada mediante Western Blot. Comparación de células no estimuladas (C-) con células estimuladas a dosis supramáximas de CCK (100nM).

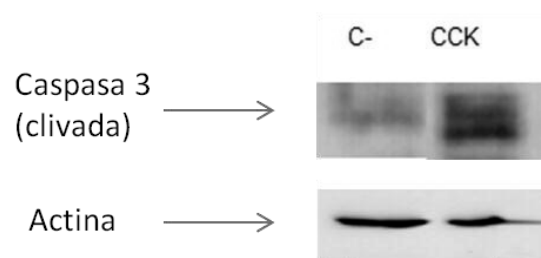


Fig. 74. Western blot de la expresión de la activación de caspasa 3 en el control negativo y en respuesta a CCK (100nM).

Se evaluó al efecto del alcohol sobre la activación de la apoptosis y no se observó un incremento significativo de la activación de las caspasas a ninguna de las concentraciones estudiadas (**figs. 75, 76**)

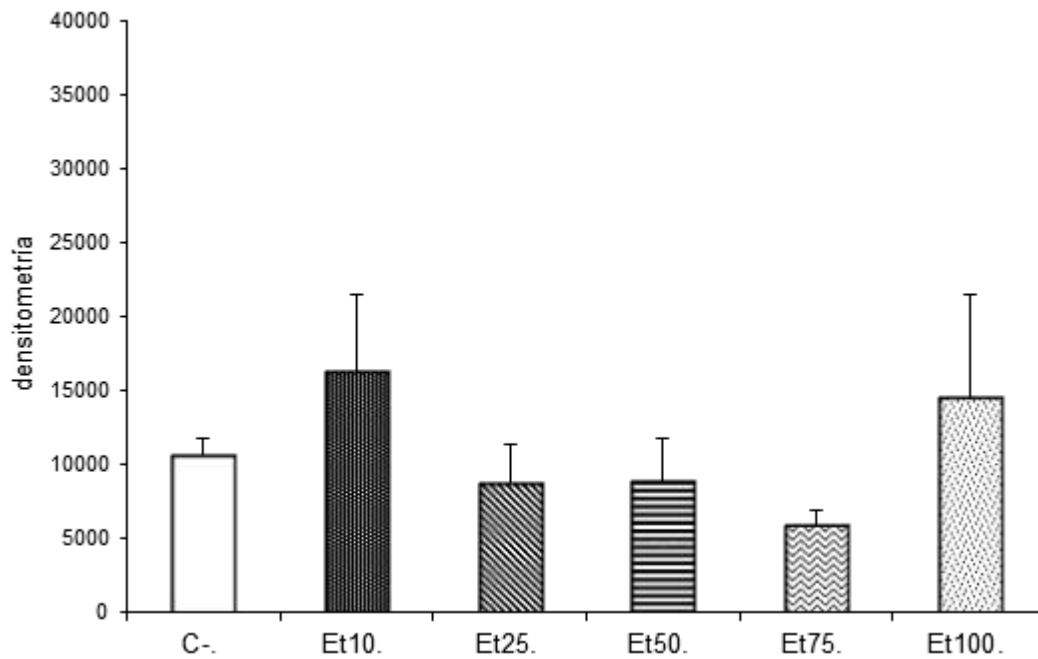


Fig . 75. Activación de caspasa 3 en el citoplasma de la célula acinar, con respecto al control negativo y en respuesta a distintas dosis de alcohol (100nM)

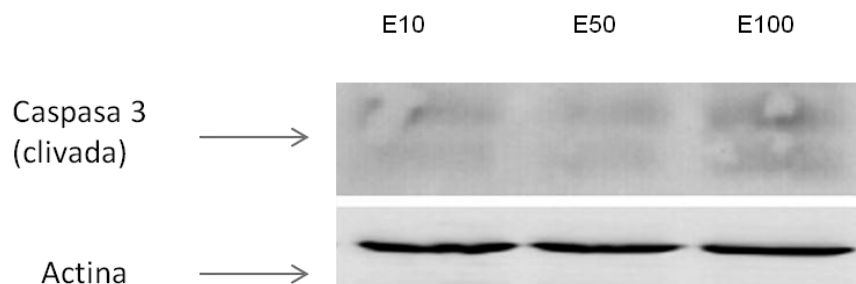


Fig. 76. Western blot de la expresión de la activación de caspasa 3 en el control negativo en respuesta a distintas concentraciones de alcohol (10, 50 y 100Mm)

Sin embargo, con respecto al tabaco, se observa una activación significativa de la caspasa 3 a dosis de 0.01 mg/ml y 0.1 mg/ml (**figs. 77, 78**). Por tanto, el tabaco induce la apoptosis celular.

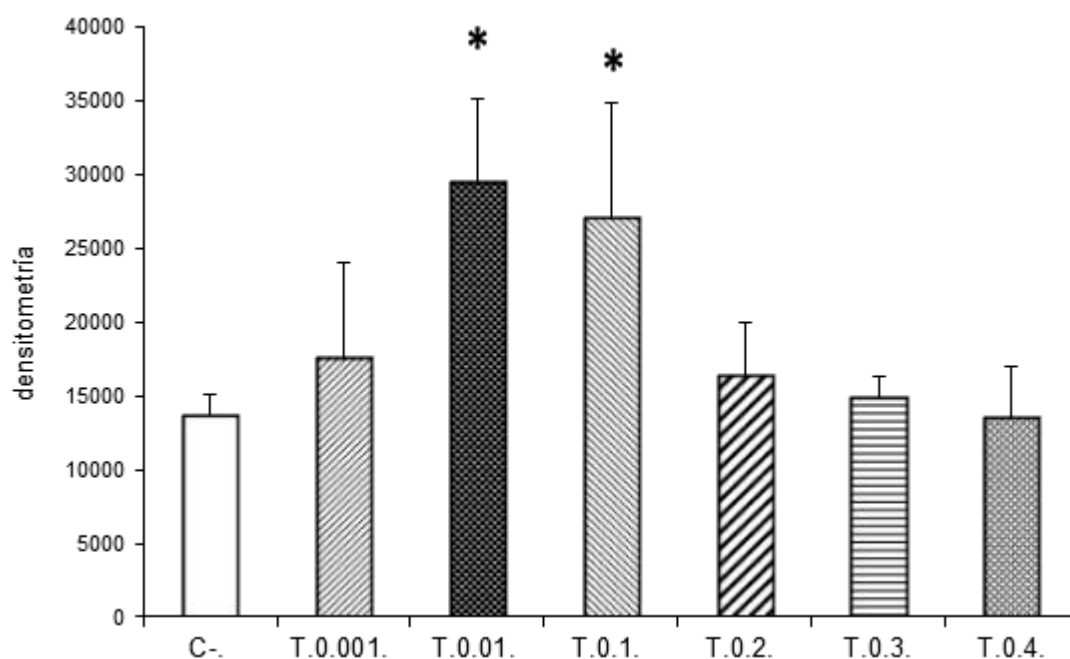


Fig. 77. Activación de caspasa 3 en el citoplasma de la célula acinar, con respecto al control negativo y en respuesta a distintas dosis de tabaco. El * indica significación estadística $p < 0.05$.

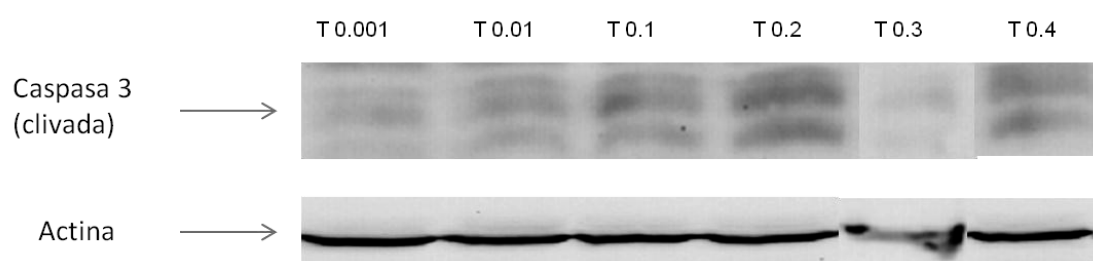


Fig.78. Western blot de la expresión de la activación de caspasa 3 en respuesta a distintas concentraciones de tabaco (0.001, 0.01, 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 mg/ml).

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo demuestran que el tabaco se asocia a distintos eventos patológicos desencadenantes de pancreatitis, independientes de la activación prematura de enzimas pancreáticas. Así, se ha demostrado que en las células acinares pancreáticas de ratón el tabaco incrementa los niveles de calcio, la secreción enzimática, la producción de especies reactivas del oxígeno e induce fenómenos de inflamación y de muerte celular. El alcohol, sin embargo, solamente produce un incremento de los niveles de calcio, sin presentar ninguna asociación con ningún otro evento patológico.

Dos factores claves en el manejo de la pancreatitis crónica son la prevención y el tratamiento. Aunque en la última década los esfuerzos por encontrar dianas terapéuticas han sido notables, hasta ahora no se ha encontrado una molécula que bloquee el proceso inflamatorio crónico ni los eventos asociados que se produce en el páncreas en relación con la pancreatitis crónica a lo largo del tiempo. Por ello, hay que hacer hincapié en el otro factor clave, la prevención, intentando evitar que se desencadene la propia enfermedad. En consecuencia, el presente trabajo de investigación traslacional se ha centrado en estudiar detalladamente el papel de los factores de riesgo que más se asocian de una forma empírica a dicha patología, pudiendo profundizar en su mecanismo de actuación de manera directa en la célula acinar pancreática y de esta manera secundariamente conocer un poco más el mecanismo patogénico global de la pancreatitis crónica.

El alcohol siempre se ha considerado el mayor factor de riesgo para el desarrollo de pancreatitis crónica y por ello durante muchos años se ha investigado el papel de este tóxico en los mecanismos patogénicos de la enfermedad (Chowdhury P. & Gupta P., 2006; Saluja AK. et al, 2003). Sin embargo, recientemente, el papel del tabaco como el principal factor tóxico asociado a la pancreatitis crónica ha ganado peso y numerosos

estudios epidemiológicos lo muestran como un factor de riesgo independiente del alcohol (Yadav D et al, 2009; Lin Y et al, 2000; Tolstrup JS et al, 2009; Law R et al, 2010). Por este motivo, considerando el tabaco un factor de riesgo para la pancreatitis crónica al menos tan importante como el alcohol, en este trabajo se evaluó la implicación del tabaco, en comparación con alcohol, en los mecanismos fisiopatogénicos tempranos de la enfermedad.

Papel de los factores tóxicos en la activación intracelular prematura en células acinares pancreáticas

La activación prematura del tripsinógeno dentro de la propia célula acinar se considera el factor patológico principal para el desarrollo del resto de los eventos asociados a pancreatitis (Saluja et al, 1999). Sin embargo, hoy en día, el mecanismo por el cual se produce este fenómeno de activación no está completamente esclarecido. Ya desde principios de la década de los 90, la mayoría de los estudios concluyen que la activación intracelular del tripsinógeno es el punto central desencadenante del resto de eventos patogénicos (Gorelick FS et al, 1992) y que la tripsina, una vez activada, es la causante de la activación del resto de proteasas de la cascada enzimática del páncreas (Rinderknecht H. 1993). Por el contrario, existen teorías que proponen que el resto de las enzimas no tienen por qué ser activadas por la tripsina, y que la tripsina en vez de un papel de activación juega un papel de protección, degradando el resto de enzimas pancreáticas activadas por otras proteasas (Lerch, 2003).

Varios trabajos apuntan que el alcohol produce una activación prematura del tripsinógeno dentro de la propia célula acinar, pero este efecto no lo causa por sí sólo si no en combinación con la CCK (Orabi et al, 2011), es decir, sensibiliza a la célula al efecto de la CCK (Gorelick FS, 2003). En el presente trabajo, analizamos el efecto del etanol aislado sobre la activación intracelular del tripsinógeno, comprobando que el alcohol, testado a distintas dosis, por sí solo no desencadena la activación enzimática intracelular. Estos resultados concuerdan con un estudio que evaluó el efecto del

etanol y otros tipos de alcoholes en la activación del tripsinógeno y quimiotripsinógeno, en el cual se observó que el etanol por sí mismo (sin estimulación por CCK) no tiene efecto en la activación intracelular enzimática (Katz M. et al, 1996). Además, para corroborar los resultados obtenidos en la activación de tripsinógeno y determinar si este era un mecanismo dependiente, evaluamos la activación de elastasa dentro de la célula, comprobando que tampoco se produce activación de esta enzima en respuesta a ninguna concentración de alcohol.

En cuanto al efecto del tabaco en la activación prematura del tripsinógeno, los datos presentados demuestran que no se produce un incremento significativo tras la exposición a distintas dosis del tóxico de esta activación enzimática. De la misma manera, el tabaco tampoco produce un incremento de la activación de proelastasa a ninguna de las dosis estudiadas. Hasta el momento son escasos los hallazgos publicados con respecto a la respuesta de las células acinares pancreáticas en estudios *in vitro* a extracto de tabaco en referencia a la activación enzimática. Sin embargo, en experimentos *in vivo* en ratas que inhalan humo de tabaco o se le administra nicotina en agua (bebida), se ha descrito que el tóxico induce un aumento de la expresión del tripsinógeno que sin embargo no está acompañado de un incremento en su activación (Wittel et al, 2006; Lindkvist B. et al, 2008).

En el presente trabajo encontramos que ni el tabaco ni el alcohol, testados a distintas dosis, inducen un incremento significativo de la activación intracelular de enzimas pancreáticas. De la misma manera, no se ha encontrado ningún efecto de estos tóxicos sobre la activación de elastasa. Así, los datos presentados no encuentran una asociación entre el tabaco o alcohol y el efecto que sobre el desarrollo de la pancreatitis crónica ejerce la activación enzimática dentro de la célula acinar. Por tanto, se hizo necesaria la búsqueda de otros mecanismos intracelulares afectados de forma patológica por los tóxicos mencionados.

Papel de los factores tóxicos en los niveles intracelulares de calcio en células acinares pancreáticas

Otro evento fisiopatológico clave asociado a la pancreatitis crónica es la variación de los niveles intracelulares de calcio dentro de la célula acinar pancreática. Hoy en día la señalización cálcica se considera un punto central para el inicio de la pancreatitis crónica (Frick TW, 2012). Recientemente se ha descubierto que el factor de transcripción nuclear dependiente de Calcio (NFATc3) se asocia con la regulación de la activación del tripsinógeno, la inflamación y el daño tisular (Awla et al, 2012). El incremento de los niveles de calcio dentro de la célula acinar se produce por la apertura de canales desde el exterior de la misma y desde el retículo endoplasmático. Concretamente, en el retículo endoplasmático, existe un receptor que se ha estudiado como posible diana terapéutica de la pancreatitis crónica, el receptor de ryanodina (RYR), cuya activación da lugar a la salida de calcio hacia el espacio citoplasmático (Orabi et al, 2010) y también se asocia a la activación prematura de zimógenos (Husain SZ et al, 2005).

Los datos obtenidos en el presente estudio, relativos al efecto del etanol sobre la variación de los niveles de calcio asociados a pancreatitis, indican que dosis crecientes de dicho tóxico, de 10 a 75 mM, producen un incremento dosis-dependiente de la concentración de calcio en la célula acinar. En concordancia con nuestros datos, existen evidencias de que el alcohol podría incrementar los niveles intracelulares de calcio por el retraso de la retirada del mismo del espacio citoplasmático (González A et al, 2008). Esto último podría explicar el aumento sostenido y no oscilatorio de los niveles de calcio intracelulares en respuesta al alcohol obtenidos en el presente estudio. Además de esto, la respuesta mantenida que se obtuvo se corrobora con la respuesta a dosis de CCK 10 nM (Okada N et al, 1998). En contraste con nuestros datos, un estudio *in vitro* en células acinares pancreáticas no ha encontrado efecto del etanol (10-850 mM) sobre los niveles de calcio intracelular, pero sí en respuesta a sus metabolitos no oxidativos (Criddle et al, 2004).

Existen estudios que han probado el efecto del etanol promoviendo la activación del tripsinógeno dentro de la célula acinar mediado por el incremento del calcio citosólico a través de IP₃, procesos que eran inhibidos por la calmodulina (Gerasimenko JV. et al, 2011, Petersen OH. Et al, 2011). En el presente proyecto se observó que efectivamente el alcohol a bajas dosis ya produce un incremento significativo de los niveles intracelulares de calcio, sin embargo ni bajas ni altas dosis de etanol estimulan la activación del tripsinógeno a tripsina, por lo que no se podría correlacionar un incremento de calcio con la activación prematura del tripsinógeno. Por tanto, el incremento de calcio producido por el alcohol, basándonos en nuestros resultados, no se asocia con la activación ni con la secreción de enzimas pancreáticas.

Pocos datos en la bibliografía hacen en referencia al papel del tabaco sobre los niveles intracelulares de calcio en la célula acinar pancreática. Un modelo de señalización en la célula acinar propone que la nicotina promueve la variación de los niveles de calcio intracelular, este aumento de calcio induce la apertura de canales para que la nicotina entre al citoplasma, asociándose a fenómenos de necrosis celular (Chowdhury P et al, 2002). En el presente trabajo se encontró por primera vez que el extracto de tabaco (0.1-0.4 mg/ml) produce un incremento significativo dosis dependiente de los niveles de calcio intracelular en células acinares pancreáticas de ratón. Corroborando el estudio de Chowdhury P y basándonos en nuestros resultados, el incremento de calcio producido por dosis altas de tabaco se podría asociar a fenómenos de muerte celular por necrosis.

Papel de los factores tóxicos en la secreción de enzimas pancreáticas

Otro mecanismo implicado en el desarrollo de pancreatitis crónica lo constituye la alteración en la secreción de enzimas pancreáticas. Por esto, el estudio del efecto que los distintos tóxicos, alcohol y tabaco, ejercen sobre la secreción de dos enzimas fundamentales, amilasa y lipasa, ha sido objeto de estudio en el presente trabajo.

En la actualidad multitud de estudios han reflejado que la CCK a dosis supramáximas incrementa significativamente la secreción de enzimas pancreáticas (Carter et al, 1987), datos que concuerdan con los resultados del presente estudio en el que observamos un incremento de la secreción de amilasa y lipasa en respuesta a CCK. Aunque existen datos en la bibliografía que establecen las concentraciones que producen incremento suprafisiológico de secreción enzimática en un rango de 100 nM a 0.01 nM de CCK, siendo máxima 0.1 nM (Rosado JA. Et al, 2002), nosotros hemos encontrado respuesta de la secreción enzimática a dosis de 100 nM de CCK, concentración que otros estudios proponen como inhibitoria (Riviera-Barreno R. et al, 2010). Otros trabajos también muestran resultados contrarios a los nuestros en los cuales una estimulación de CCK en la célula acinar pancreática supone una inhibición de la secreción (Kubisch et al, 2007). Las diferencias entre estos estudios y nuestros datos habría que buscarlos en diferencias en el protocolo experimental utilizado.

Estudios previos *in vivo* han observado que el alcohol, administrado de forma crónica, inhibe de forma dosis-dependiente la secreción basal de enzimas pancreáticas, mediante la reorganización de los filamentos de actina (Siegmund E. et al, 2004). Este efecto se revierte al retirar la administración de alcohol (Deng X. et al, 2004). Se ha demostrado que la inhibición de la secreción de amilasa se debe al cambio de polaridad de las vesículas de secreción, trasladándose del polo apical al polo basolateral (Lamp PP. et al, 2007; Cose-Binker LI. et al, 2008). En contraste a lo descrito, en nuestro modelo de células acinares obtenidas de páncreas de ratón no se encontró una modificación significativa de la secreción basal de la amilasa ni de lipasa en respuesta a altas ni bajas dosis de alcohol.

Respecto al efecto del tabaco en la secreción de enzimas pancreáticas por parte de las células acinares, nuestros resultados muestran un incremento de la secreción de enzimas en respuesta a dosis altas de tabaco. Estos datos concuerdan con estudios realizados en células acinares pancreáticas en respuesta a nicotina, en los cuales la nicotina incrementaba la secreción enzimática a los 90 minutos (Majumdar et al, 1985). Por tanto, hemos comprobado que no sólo la nicotina, sino también el extracto de tabaco incrementa la secreción enzimática tras 1, 2 y 3 horas de estimulación de las células. Esta alteración también se ha encontrado en los niveles de enzimas

pancreáticas en suero y en células acinares pancreáticas de ratas alimentadas con nicotina (Dubick et al, 1988; Lau PP et al, 1990). En contraste con nuestros resultados, otros estudios en los años 90 establecieron que la nicotina disminuía la secreción enzimática del páncreas exocrino (Chowdhury P et al, 1991; Chowdhury P et al, 1992; Chowdhury P et al, 1995), proponiendo este hecho como causante de daño tisular. La particularidad de estos estudios fue que estudiaban el efecto de la nicotina sobre la estimulación de la secreción producida por CCK y observaron su disminución, pero no evaluaron el efecto directo de la nicotina como potencial secretagogo por sí mismo.

El aumento de la secreción de amilasa producida por el tabaco no se refleja en la secreción de lipasa a los tiempos de incubación evaluados. Esta diferencia puede ser debida a que la lipasa tiene un patrón de secreción más tardío que la amilasa, lo que puede sugerir que un incremento mayor se produciría en tiempos posteriores.

Asociación del efecto de los factores tóxicos con el proceso inflamatorio en la célula acinar.

La célula acinar pancreática adquiere la capacidad de sintetizar y secretar moléculas pro- y anti-inflamatorias en situaciones patológicas como es el caso de la pancreatitis crónica (Dios ID., 2010). Estas moléculas, citokinas y otros factores inflamatorios, van a activar a las células proinflamatorias y producir una infiltración de las mismas en el parénquima pancreático, desencadenando la inflamación local.

El etanol, como principal factor de riesgo, ha sido implicado en los procesos inflamatorios asociados a la pancreatitis crónica. Un estudio in vivo demostró que en ratas alimentadas con etanol durante 14 semanas se reduce significativamente la producción de moléculas pro-inflamatorias como IL1 β y TNF α , sin embargo aumenta el daño mitocondrial y la activación de tripsina en ausencia de inflamación (Fortunato F. et al, 2007). En el presente trabajo no encontramos una respuesta a ninguna de las concentraciones de alcohol estudiadas en el proceso inflamatorio en células acinares pancreáticas de ratón, si bien, la exposición al estímulo fue mucho más

breve, tampoco encontramos una inhibición del mismo. Por otra parte, se observó que el etanol sensibiliza a las células acinares al efecto de la CCK en la activación del NFkappaB mediada por la activación de la PKC (Sato A. et al, 2006).

Otro trabajo realizado en humanos muestra los diferentes patrones de los efectos del alcohol; un consumo moderado prolongado tendría un efecto pro-inflamatorio, sin embargo un consumo excesivo agudo o una exposición prolongada al alcohol tendría un efecto anti-inflamatorio (Szabo G. et al, 2007). En otros tipos celulares, se observa que el consumo moderado de alcohol produce un efecto antiinflamatorio incrementando los niveles de IL 10 y disminuyendo NFkappaB evaluado en monocitos sanguíneos humanos (Mandrekar P. et al, 2006). Nuestros datos, sin embargo, no muestran una inhibición del proceso inflamatorio en respuesta a ninguna de las dosis estudiadas de alcohol.

Poco se conoce hasta el momento en cuanto al efecto del tabaco en el proceso inflamatorio de las células acinares pancreáticas. En otros tipos celulares, sin embargo, se sabe que el extracto de tabaco produce activación de NFkappaB de una manera dosis dependiente en líneas celulares de linfoma histiocítico humano (U-937), células T (Jurkat), células de pulmón (H1299) y células escamosas de cabeza y cuello (1483 y 14B) (Anto RJ et al, 2002). Otro estudio más reciente también observó que el extracto de tabaco produce la activación de NFkappaB en células epiteliales de oreja murina (Preciado D et al, 2010). De forma contraria, se ha visto que la nicotina tiene un efecto inmunomodulante, con efectos inmunosupresores en linfocitos y macrófagos reduciendo los niveles de citoquinas proinflamatorias como la interleukina 1 beta (Thomas GA. et al, 2005).

Los resultados aquí presentados demuestran que la administración de extracto de tabaco a las células acinares pancreáticas produce un aumento de la activación del factor de transcripción nuclear NFkappaB, siendo sólo significativo a dosis de 0.1 mg/ml. La tendencia observada nos lleva a pensar en la posibilidad de un proceso inflamatorio en la célula acinar inducido por la administración de este tóxico. Observamos también que finalmente este hecho no se traduce en una secreción de interleukina 1 beta, esto podría ser explicado en base a la posibilidad de que la

secreción de citokinas se produce en una etapa más tardía. Se ha descrito que dosis muy bajas de extracto de tabaco producen un incremento en la expresión de moléculas proinflamatorias tales como la interleukina 1 beta en células epiteliales alveolares de pulmón (Hellermann GR et al, 2002), sin embargo este efecto no se produce en las células acinares del páncreas. Por tanto, podríamos deducir que el tabaco estimula el comienzo del proceso inflamatorio en células acinares pancreáticas. Es importante resaltar que a las 3 horas de incubación con dosis supramáximas de CCK tampoco se ha encontrado un incremento de la secreción de interleukina 1 beta, a diferencia de estudios previos donde se produce una secreción de esta citokina ya a los 60 min de la estimulación (Tamizhselvi R. et al, 2009).

Factores tóxicos y su asociación a la producción de especies reactivas del oxígeno en la célula acinar pancreática.

Hoy en día la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) se considera un proceso de carácter central en la patogenia de la pancreatitis crónica. La generación de ROS se asocia con fenómenos de muerte celular (Booth DM et al, 2011) y con el desarrollo del proceso inflamatorio (Ehlers RA et al, 1999) e incluso hay trabajos que proponen las especies reactivas del oxígeno como causantes de la activación intracelular enzimática. De hecho, se han estudiado tratamientos antioxidantes como potenciales tratamientos de elección para ralentizar la progresión de la pancreatitis crónica (González A et al, 2012).

Se ha descrito que una estimulación de las células acinares pancreáticas por dosis supramáximas de CCK (10 nM) produce un aumento de la producción de ROS dentro de la célula acinar (Granados et al, 2004). Por el contrario, en el presente trabajo nosotros no hemos observado un incremento de ROS frente a dichas concentraciones de CCK.

En estudios previos se ha observado que el alcohol desempeña un papel en la producción de especies reactivas del oxígeno por parte de la célula acinar pancreática.

Estos estudios han sugerido que este tóxico estimula la generación de ROS (Wittel UA et al, 2003) y que esto está mediado por el aumento de los niveles intracelulares de calcio (Fernandez-Sanchez M. et al, 2009). En oposición a estos hallazgos previos, en el presente trabajo no se observó un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno a ninguna de las concentraciones de alcohol estudiadas. Los datos obtenidos demuestran que el alcohol por sí sólo no altera el balance oxidativo de la célula acinar pancreática y, además, aunque se produce un incremento intracelular del calcio inducido por el alcohol este mecanismo no se asocia con la producción de ROS en nuestro modelo de célula acinar.

A diferencia de lo observado en el caso del alcohol, los datos presentados en este trabajo demuestran, por primera vez, que el tabaco en concentraciones altas estimula la producción de especies reactivas del oxígeno por parte de la célula acinar pancreática. Nuestros resultados concuerdan con estudios previos en los encontraron que la nicotina incrementa la producción de especies reactivas del oxígeno en líneas celulares pancreáticas AR42J (Chowdhury P et al, 2008) y este hecho desencadena el daño celular. Se podría deducir que el efecto que el tabaco ejerce sobre la producción de especies reactivas del oxígeno puede ser debido, al menos en parte, a su componente mayoritario, la nicotina. Estudios realizados en otras líneas celulares con fibroblastos, también han demostrado un incremento en la producción de ROS en respuesta al tabaco (Branski RC et al, 2009).

Las especies reactivas del oxígeno juegan un papel importante ya que pueden causar daños celulares a nivel del ADN, peroxidación lipídica y modificaciones proteicas (Wu et al, 2006), asociándose a procesos de muerte celular. En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, proponemos que el tabaco incrementa la producción de especies reactivas del oxígeno en la mitocondria y este hecho está asociado a fenómenos de necrosis celular. La mayoría de los trabajos realizados hasta ahora relacionan la producción de especies reactivas del oxígeno con fenómenos de apoptosis y no de necrosis (Booth DM et al, 2011). En contraste nuestros resultados demuestran que las concentraciones de tabaco que incrementan la producción de especies reactivas del oxígeno se correlacionan con fenómenos de muerte celular por necrosis, no por apoptosis.

Las especies reactivas del oxígeno se asocian al incremento de la concentración de calcio intracelular y a la disminución de la viabilidad celular (González et al, 2012) Además se conoce que en células acinares pancreáticas el incremento de calcio intracelular y la producción de ROS están asociados a daño celular (Gukovskaya AS & Gukovsky I., 2011) con la consecuente producción de lactato deshidrogenasa (Weber H et al, 1998). Basándonos en nuestros resultados, el presente trabajo propone un modelo de daño celular en respuesta a tabaco en el cual altas dosis de tabaco producen un incremento de niveles intracelulares de calcio que se asocian a la producción de especies reactivas del oxígeno y podrían desencadenar, por tanto, procesos de muerte celular.

Los estudios realizados hasta la actualidad en cuanto a la relación de la producción de radicales libres con la alteración de la secreción enzimática son contradictorios. Por una parte hay estudios que proponen que la producción de ROS se asocia a inhibición de secreción enzimática (Han B et al, 2000), por el contrario otros sugieren que ROS produce la reorganización de los filamentos de actina lo que da lugar a la secreción de amilasa (Rosado JA et al, 2002). Este último estudio apoyaría nuestros hallazgos, en los cuales el incremento de la producción de ROS en respuesta a dosis altas de tabaco (0.3 y 0.4 mg/ml) se podría asociar con el incremento de la secreción de amilasa en células acinares pancreáticas.

Papel de los factores tóxicos en los fenómenos de muerte celular: necrosis y apoptosis.

Dentro de los fenómenos de muerte celular, la célula presenta dos mecanismos principales de muerte celular: la apoptosis y la necrosis. La disrupción del balance necrosis/apoptosis en las células acinares pancreáticas se asocia con la gravedad de la pancreatitis.

El alcohol por sí solo, incluso a altas concentraciones, apenas ejerce efecto alguno sobre la funcionalidad de las células acinares pancreáticas (Criddle DN. et al, 2006). Sin

embargo sus metabolitos no oxidativos pueden causar muerte celular, apoptosis mediada por caspasas dependiente de los niveles de calcio (Wu D. et al, 2008). Los resultados presentados, sin embargo, demuestran que el etanol no produce fenómenos de muerte celular por necrosis y, aunque sí aumenta los niveles de calcio dentro de la célula éste hecho no está asociado con la inducción de necrosis.

Por el contrario, los datos relativos al efecto del tabaco demuestran que dosis altas de este tóxico inducen una elevación del porcentaje de necrosis celular y producción de lactato deshidrogenasa, fenómeno que se puede asociar con un incremento de la concentración intracelular de calcio y a la producción de especies reactivas del oxígeno a esas mismas dosis.

Por otra parte, estudios previos observaron que la nicotina incrementa la apoptosis en células beta del páncreas, mediada por la mitocondria (Bruin J et al, 2008), sin embargo se ha observado que el extracto de tabaco inhibe las rutas apoptóticas e induce la necrosis en líneas celulares tumorales (Wickenden JA et al, 2003). En el presente trabajo por primera vez se ha encontrado un efecto dual del tabaco, bajas concentraciones de tabaco estimulan procesos de apoptosis en la célula acinar mediado por caspasas, sin embargo altas concentraciones de tabaco producen fenómenos de necrosis celular con producción de lactato deshidrogenasa. Este efecto dual se ha encontrado también en un estudio en células endoteliales en el cual bajas concentraciones de extracto de tabaco producen fenómenos de apoptosis y altas concentraciones promueven la necrosis celular (Messner B. et al, 2012). La ocurrencia de fenómenos tanto de apoptosis como de necrosis se puede asociar al nivel o al patrón de incremento de calcio intracelular (Criddle DN et al, 2007).

Resumen

El presente trabajo aporta datos relevantes que contribuyen a la modificación del modelo clásicamente aceptado sobre la patogenia de la pancreatitis crónica con respecto al papel de los tóxicos. En nuestro modelo de células acinares obtenidas de páncreas de ratón hemos encontrado que el alcohol no presenta un efecto tan potente sobre distintos eventos patológicos relacionados con el proceso de pancreatitis como se le había atribuido en diversos trabajos publicados. En contraste, hemos demostrado un papel clave del tabaco sobre distintos mecanismos implicados en el desarrollo de la pancreatitis crónica. En resumen, hemos comprobado que el tabaco produce un incremento de los niveles intracelulares de calcio en la célula acinar, fenómeno que se puede asociar con un incremento en la secreción de enzimas pancreáticas encontrado en nuestro modelo en respuesta a la administración de tabaco. Además, comprobamos que el tabaco estimula el proceso inflamatorio y la producción de especies reactivas del oxígeno en la célula acinar, lo cual podemos asociar a procesos de muerte celular, tanto apoptosis como necrosis.

En cuanto a la aplicación clínica, podemos decir que en base a nuestros hallazgos, el papel del tabaco debe ser considerado como un factor clave implicado en los eventos patológicos tempranos asociados a la pancreatitis crónica (fig. 77). Estos resultados contribuyen a replantearnos varios aspectos en la clasificación etiológica de la pancreatitis crónica. En primer lugar podemos establecer que un paciente fumador sin consumo alcohólico no tiene una pancreatitis crónica de origen idiopático si no que se podría introducir el término *pancreatitis crónica tabáquica*. En segundo lugar, en un paciente con pancreatitis crónica de cualquier otra etiología así como en familiares de pacientes con pancreatitis crónica hereditaria, se considerará de gran relevancia la abstención total al consumo de tabaco, ya que en la actualidad la pancreatitis crónica se considera una enfermedad con una etiología multifactorial. De manera global hay que considerar los resultados del presente trabajo como una aportación al manejo de pacientes y prevención de pancreatitis crónica en la rutina clínica diaria.

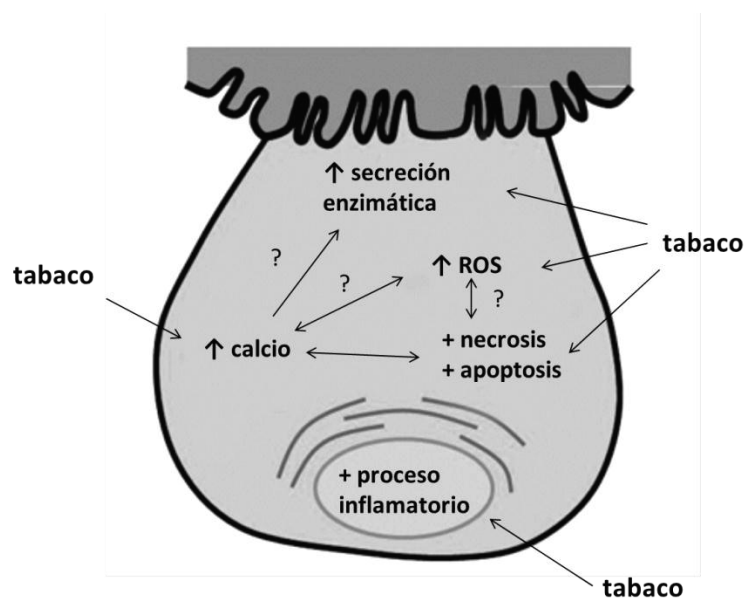


Fig. 77. Modelo de actuación del tabaco sobre los eventos patogénicos asociados a la pancreatitis crónica en la célula acinar pancreática en base a nuestros hallazgos.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. El tabaco produce alteraciones fisiopatológicas en la célula acinar pancreática asociadas al desarrollo de pancreatitis crónica, hallazgo de suma importancia desde el punto de vista de la investigación traslacional con aplicación directa a la clínica en el manejo de pacientes con pancreatitis crónica.
2. Al igual que el alcohol, el tabaco no es capaz de producir por si sólo un incremento de la activación prematura de las enzimas pancreáticas, tripsina y elastasa, dentro de la célula acinar pancreática.
3. El tabaco produce un incremento de la concentración intracelular de calcio en la célula acinar pancreática, similar a la producida por el alcohol.
4. El tabaco, pero no el alcohol, produce un incremento de la secreción de enzimas pancreáticas por la célula acinar pancreática.
5. El tabaco, pero no el alcohol, incrementa de forma significativa la producción de especies reactivas del oxígeno dentro de la propia célula acinar.
6. El tabaco, pero no el alcohol, desencadena el inicio de la respuesta inflamatoria, incrementando la activación del factor de transcripción NFkappaB en la célula acinar (en respuesta dosis de 0.1 mg/ml), pero no la secreción de Interleukina 1 beta.
7. El tabaco, pero no el alcohol, induce fenómenos de muerte celular, tanto necrosis como apoptosis en la célula acinar pancreática.

8. Como consecuencia de todos estos hallazgos, el tabaco debe ser establecido como factor de riesgo clave implicado en los eventos patológicos tempranos asociados a la pancreatitis crónica y así considerar su abstinencia como parte de las estrategias de prevención y tratamiento de la enfermedad.

8. *PERSPECTIVAS DE FUTURO*

8. PERSPECTIVAS DE FUTURO

En base a los hallazgos obtenidos en el presente trabajo, las perspectivas de futuro se enfocan a ampliar esta línea de investigación profundizando en el estudio de la fisiopatología de la célula acinar, con el fin de analizar los mecanismos de actuación de los tóxicos alcohol y tabaco. En primer lugar y como continuidad inmediata de los datos aquí presentados, evaluar el efecto de la asociación de los dos tóxicos en la célula acinar pancreática. En segundo lugar, se propone estudiar el papel del tabaco en los eventos fisiopatológicos tempranos asociados a la pancreatitis crónica en animales de experimentación *in vivo*. Por otra parte, se está llevando a cabo el diseño un proyecto en suero de pacientes diagnosticados de pancreatitis crónica para el análisis detallado de las moléculas que intervienen en el proceso inflamatorio, y ver su asociación con la etiología tabáquica. Por último, y uno de las perspectivas de futuro fundamentales en esta línea, es desarrollar un proyecto para la búsqueda de potenciales dianas terapéuticas en la fisiopatogenia de la célula acinar.

En este sentido, se considera sumamente importante la continuación de dicha línea de investigación con el fin de mejorar el manejo y tratamiento de pacientes diagnosticados de pancreatitis crónica en la rutina clínica.

9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

Alberts B. Biología molecular de la célula. En: *Biología molecular de la célula*, Alberts B. et al. (eds), Cap. 13 y 15. Barcelona: Omega, D.L., 2010.

Allam E, Zhang W, Al-Shibani N, Sun J, Labban N, Song F, Windsor LJ. Effects of cigarette smoke condensate on oral squamous cell carcinoma cells. *Arch Oral Biol*. 2011 Oct; 56(10):1154-61.

Andre L, Fauconnier J, Reboul C, Feillet-Coudray C, Meschin P, Farah C, Fouret G, Richard S, Lacampagne A, Cazorla O. Subendocardial Increase in Reactive Oxygen Species Production Affects Regional Contractile Function in Ischemic Heart Failure. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Oct 26.

Anto RJ, Mukhopadhyay A, Shishodia S, Gairola CG, Aggarwal BB. Cigarette smoke condensate activates nuclear transcription factor-kappaB through phosphorylation and degradation of IkappaB(alpha): correlation with induction of cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis*. 2002 Sep; 23(9):1511-8.

Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut*. 1998 Jul; 43(1):128-33.

Apte MV, Norton ID, Haber PS, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS. Both ethanol and protein deficiency increase messenger RNA levels for pancreatic lithostathine. *Life Sci*. 1996; 58(6):485-92.

Apte MV, Wilson JS. Alcohol-induced pancreatic injury. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2003 Aug; 17(4):593-612.

Awla D, Hartman H, Abdulla A, Zhang S, Rahman M, Regnér S, Thorlacius H. Rho-kinase signalling regulates trypsinogen activation and tissue damage in severe acute pancreatitis. *Br J Pharmacol*. 2011 Feb;162 (3): 648-58.

Awla D, Zetterqvist AV, Abdulla A, Camello C, Berglund LM, Spéjel P, Pozo MJ, Camello PJ, Regnér S, Gomez MF, Thorlacius H. NFATc3 Regulates Trypsinogen Activation, Neutrophil Recruitment, and Tissue Damage in Acute Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology*. 2012 Nov;143 (5): 1352-1360

Bae GS, Kim MS, Jeong J, Lee HY, Park KC, Koo BS, Kim BJ, Kim TH, Lee SH, Hwang SY, Shin YK, Song HJ, Park SJ. Piperine ameliorates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis by inhibiting the activation of mitogen activated protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Jul 8; 410 (3): 382-8.

Belan, PV, Gerasimenko OV, Tepikin AV, Petersen OH. Localization of Ca²⁺ Extrusion Sites in Pancreatic Acinar Cells. *J Biol Chem* 271, 7615-19, 1996.

Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol*. 2000 Feb; 190(2): 117-25.

Binker MG, Binker-Cosen AA, Richards D, Gaisano HY, de Cosen RH, Cosen-Binker LI. Chronic stress sensitizes rats to pancreatitis induced by cerulein: role of TNF- α . *World J Gastroenterol*. 2010 Nov 28; 16(44): 5565-81.

Booth DM, Murphy JA, Mukherjee R, Awais M, Neoptolemos JP, Gerasimenko OV, Tepikin AV, Petersen OH, Sutton R, Criddle DN. Reactive oxygen species induced by bile acid induce apoptosis and protect against necrosis in pancreatic acinar cells. *Gastroenterology*. 2011 Jun; 140 (7): 2116-25.

Bosoi CR, Rose CF. Oxidative stress: a systemic factor implicated in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis*. 2012 Nov 6.

Branski RC, Saltman B, Sulica L, Szeto H, Duflo S, Felsen D, Kraus DH. Cigarette smoke and reactive oxygen species metabolism: implications for the pathophysiology of Reinke's edema. *Laryngoscope*. 2009 Oct; 119 (10): 2014-8.

Bruin JE, Gerstein HC, Morrison KM, Holloway AC. Increased pancreatic beta-cell apoptosis following fetal and neonatal exposure to nicotine is mediated via the mitochondria. *Toxicol Sci.* 2008 Jun;103(2):362-70.

Campos-Toimil M, Bagrij T, Edwardson JM, Thomas P. Two modes of secretion in pancreatic acinar cells: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and regulation by capacitative Ca^{2+} entry. *Curr Biol.* 2002 Feb 5;12(3):211-5.

Campos-Toimil M, Bagrij T, Edwardson JM, Thomas P. Two modes of secretion in pancreatic acinar cells: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and regulation by capacitative Ca^{2+} entry. *Curr Biol* 12, 211-5, 2002.

Campos-Toimil M, Edwardson JM, Thomas P. Acetylcholine-induced zymogen granule exocytosis: comparison between acini and single pancreatic acinar cells. *Pancreas.* 2002 Mar; 24(2):179-83.

Carter KJ, Rutledge PL, Steer ML, Silen W. Secretagogue-induced changes in intracellular pH and amylase release in mouse pancreatic acini. *Am J Physiol.* 1987 Nov;253 (5 Pt 1):G690-6.

Chan YC, Leung PS. Co-operative effects of angiotensin II and caerulein in NF κ B activation in pancreatic acinar cells in vitro. *Regul Pept.* 2011 Jan 17;166(1-3):128-34.

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59:527-605.

Chowdhury P, Ami M, Hosotani R, Rayford PL. Meal-stimulated exocrine pancreatic secretion and release of GI peptides in normal and nicotine-treated rats. *Regul Pept.* 1991 Mar 26; 33(1):11-20.

Chowdhury P, Doi R, Chang LW, Rayford PL. Tissue distribution of [^3H]-nicotine in rats. *Biomed Environ Sci.* 1993 Mar;6(1):59-64.

Chowdhury P, Doi R, Tangoku A, Rayford PL. Structural and functional changes of rat exocrine pancreas exposed to nicotine. *Int J Pancreatol.* 1995 Dec;18(3):257-64.

Chowdhury P, Gupta P. Pathophysiology of alcoholic pancreatitis: an overview. *World J Gastroenterol*. 2006 Dec 14;12(46):7421-7.

Chowdhury P, MacLeod S, Udupa KB, Rayford PL. Pathophysiological effects of nicotine on the pancreas: an update. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002 Jul; 227(7):445-54.

Chowdhury P, Rayford PL, Chang LW. Induction of pancreatic acinar pathology via inhalation of nicotine. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1992 Nov;201(2):159-64.

Chowdhury P, Udupa KB. Nicotine as a mitogenic stimulus for pancreatic acinar cell proliferation. *World J Gastroenterol*. 2006 Dec 14;12(46):7428-32.

Chowdhury P, Walker A. A cell-based approach to study changes in the pancreas following nicotine exposure in an animal model of injury. *Langenbecks Arch Surg*. 2008 Jul;393(4):547-55.

Chu PY, Srinivasan P, Deng JF, Liu MY. Sesamol attenuates oxidative stress-mediated experimental acute pancreatitis in rats. *Hum Exp Toxicol*. 2012 Apr;31(4):397-404.

Clapham, E. Calcium Signaling. *Cell*, 2007; 131, 1047–1058.

Closa Autet, D. Fisiopatología. En: Navarro S., Pérez-Mateo M., Guarner L. (ed). *Tratado de páncreas exocrino*. Barcelona: J&C Ediciones Médicas, 2002. p. 133–138.

Cosen-Binker LI, Binker MG, Wang CC, Hong W, Gaisano HY. VAMP8 is the v-SNARE that mediates basolateral exocytosis in a mouse model of alcoholic pancreatitis. *J Clin Invest*. 2008 Jul;118(7):2535-51.

Criddle DN, Gerasimenko JV, Baumgartner HK, Jaffar M, Voronina S, Sutton R, Petersen OH, Gerasimenko OV. Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis?. *Cell Death Differ*. 2007 Jul;14(7):1285-94.

Criddle DN, Raraty MG, Neoptolemos JP, Tepikin AV, Petersen OH, Sutton R. Ethanol toxicity in pancreatic acinar cells: mediation by nonoxidative fatty acid metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 20;101(29):10738-43.

Criddle DN, Sutton R, Petersen OH. Role of Ca²⁺ in pancreatic cell death induced by alcohol metabolites. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006 Oct;21 Suppl 3:S14-7.

Deng X, Wood PG, Eagon PK, Whitcomb DC. Chronic alcohol-induced alterations in the pancreatic secretory control mechanisms. *Dig Dis Sci*. 2004 May;49(5):805-19.

Dios ID. Inflammatory role of the acinar cells during acute pancreatitis. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2010 Feb 6;1(1):15-20.

Doi R, Chowdhury P, Nishikawa M, Takaori K, Inoue K, Imamura M, Rayford PL. Carbachol and cholecystokinin enhance accumulation of nicotine in rat pancreatic acinar cells. *Pancreas*. 1995 Mar;10(2):154-60.

Dolai S, Liang T, Lam PP, Fernandez NA, Chidambaram S, Gaisano HY. Effects of ethanol metabolites on exocytosis of pancreatic acinar cells in rats. *Gastroenterology*. 2012 Sep;143(3):832-43.

Domínguez Muñoz JE, ed. *Clinical Pancreatology for practising gastroenterologists and surgeons*. Blackwell Science. Oxford 2005.

Dubick MA, Palmer R, Lau PP, Morrill PR, Geokas MC. Altered exocrine pancreatic function in rats treated with nicotine. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1988 Oct;96(1):132-9.

Ehlers RA, Hernandez A, Bloemendal LS, Ethridge RT, Farrow B, Evers BM. Mitochondrial DNA damage and altered membrane potential ($\Delta\psi$) in pancreatic acinar cells induced by reactive oxygen species. *Surgery*. 1999 Aug; 126(2):148-55.

Etemad B, Whitcomb DC. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology*. 2001 Feb; 120(3):682-707.

Fernández-Sánchez M, del Castillo-Vaquero A, Salido GM, González A. Ethanol exerts dual effects on calcium homeostasis in CCK-8-stimulated mouse pancreatic acinar cells. *BMC Cell Biol*. 2009 Oct 30; 10:77.

Fortunato F, Berger I, Gross ML, Rieger P, Buechler MW, Werner J. Immune-compromised state in the rat pancreas after chronic alcohol exposure: the role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Pathol.* 2007 Dec;213(4):441-52.

Fortunato F, Deng X, Gates LK, McClain CJ, Bimmler D, Graf R, Whitcomb DC. Pancreatic response to endotoxin after chronic alcohol exposure: switch from apoptosis to necrosis? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006 Feb;290(2):G232-41.

Frick TW. The role of calcium in acute pancreatitis. *Surgery.* 2012 Sep; 152(3 Suppl 1):S157-63.

Gerasimenko JV, Lur G, Ferdek P, Sherwood MW, Ebisui E, Tepikin AV, Mikoshiba K, Petersen OH, Gerasimenko OV. Calmodulin protects against alcohol-induced pancreatic trypsinogen activation elicited via Ca²⁺ release through IP₃ receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Apr 5; 108(14):5873-8.

Gerasimenko JV, Lur G, Sherwood MW, Ebisui E, Tepikin AV, Mikoshiba K, Gerasimenko OV, Petersen OH. Pancreatic protease activation by alcohol metabolite depends on Ca²⁺ release via acid store IP₃ receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jun 30; 106(26):10758-63.

González A, Núñez AM, Granados MP, Pariente JA, Salido GM. Ethanol impairs CCK-8-evoked amylase secretion through Ca²⁺-mediated ROS generation in mouse pancreatic acinar cells. *Alcohol.* 2006 Jan; 38(1):51-7.

González A, Pariente JA, Salido GM. Ethanol impairs calcium homeostasis following CCK-8 stimulation in mouse pancreatic acinar cells. *Alcohol.* 2008 Nov; 42(7):565-73.

González A, Santofimia-Castaño P, Rivera-Barreno R, Salido GM. Cinnamtannin B-1, a natural antioxidant that reduces the effects of H₂O₂ on CCK-8-evoked responses in mouse pancreatic acinar cells. *J Physiol Biochem.* 2012 Jun; 68(2):181-91.

Gorelick F, Pandol S, Thrower E. Protein kinase C in the pancreatic acinar cell. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008 Mar; 23 Suppl 1:S37-41.

Gorelick FS, Modlin IM, Leach SD, Carangelo R, Katz M. Intracellular proteolysis of pancreatic zymogens. *Yale J Biol Med*. 1992 Sep-Oct; 65(5):407-20; discussion 437-40.

Gorelick FS, Thrower E. The acinar cell and early pancreatitis responses. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009 Nov; 7(11 Suppl):S10-4.

Gorelick FS. Alcohol and zymogen activation in the pancreatic acinar cell. *Pancreas*. 2003 Nov; 27(4):305-10.

Grady T, Mah'Moud M, Otani T, Rhee S, Lerch MM, Gorelick FS. Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury. *Am J Physiol*. 1998 Nov; 275(5 Pt 1):G1010-7.

Grady T, Saluja A, Kaiser A, Steer M. Edema and intrapancreatic trypsinogen activation precede glutathione depletion during caerulein pancreatitis. *Am J Physiol*. 1996 Jul; 271(1 Pt 1):G20-6.

Granados MP, Salido GM, Pariente JA, González A. Generation of ROS in response to CCK-8 stimulation in mouse pancreatic acinar cells. *Mitochondrion*. 2004 Apr; 3(5):285-96.

Gukovskaya AS, Gukovsky I, Jung Y, Mouria M, Pandol SJ. Cholecystokinin induces caspase activation and mitochondrial dysfunction in pancreatic acinar cells. Roles in cell injury processes of pancreatitis. *J Biol Chem*. 2002 Jun 21; 277(25):22595-604.

Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, Song M, Sandoval D, Gukovsky S, Pandol SJ. Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor- α . Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest*. 1997 Oct 1; 100(7):1853-62.

Gukovskaya AS, Gukovsky I. Which way to die: the regulation of acinar cell death in pancreatitis by mitochondria, calcium, and reactive oxygen species. *Gastroenterology*. 2011 Jun; 140(7):1876-80.

Gukovskaya AS, Hosseini S, Satoh A, Cheng JH, Nam KJ, Gukovsky I, Pandol SJ. Ethanol differentially regulates NF- κ B activation in pancreatic acinar cells through calcium

and protein kinase C pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004 Feb; 286(2):G204-13.

Gukovskaya AS, Mareninova OA, Odinkova IV, Sung KF, Lugea A, Fischer L, Wang YL, Gukovsky I, Pandol SJ. Cell death in pancreatitis: effects of alcohol. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006 Oct; 21.

Gukovskaya AS, Mouria M, Gukovsky I, Reyes CN, Kasho VN, Faller LD, Pandol SJ. Ethanol metabolism and transcription factor activation in pancreatic acinar cells in rats. *Gastroenterology*. 2002 Jan; 122(1):106-18.

Gukovskaya AS, Pandol SJ. Cell death pathways in pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreatol*. 2004; 4(6):567-86.

Gukovskaya AS, Vaquero E, Zaninovic V, Gorelick FS, Lusa AJ, Brennan ML, Holland S, Pandol SJ. Neutrophils and NADPH oxidase mediate intrapancreatic trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 2002 Apr; 122(4):974-84.

Gukovsky I, Gukovskaya AS, Blinman TA, Zaninovic V, Pandol SJ. Early NF-kappaB activation is associated with hormone-induced pancreatitis. *Am J Physiol*. 1998 Dec; 275(6 Pt 1):G1402-14.

Gukovsky I, Pandol SJ, Gukovskaya AS. Organellar dysfunction in the pathogenesis of pancreatitis. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Nov 15; 15(10):2699-710.

Guyton, A. Tratado de fisiología médica. En *Tratado de fisiología médica*, Guyton A., Hall CJ (eds) 752-755. Madrid: Elsevier, 2009.

Halangk W, Krüger B, Ruthenbürger M, Stürzebecher J, Albrecht E, Lippert H, Lerch MM. Trypsin activity is not involved in premature, intrapancreatic trypsinogen activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002 Feb; 282(2):G367-74.

Halangk W, Stürzebecher J, Matthias R, Schulz HU, Lippert H. Trypsinogen activation in rat pancreatic acinar cells hyperstimulated by caerulein. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Dec 31; 1362(2-3):243-51.

Han B, Ji B, Logsdon CD. CCK independently activates intracellular trypsinogen and NF-kappaB in rat pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 Mar; 280(3):C465-72.

Han B, Klonowski-Stumpe H, Lüthen R, Schreiber R, Häussinger D, Niederau C. Menadione-induced oxidative stress inhibits cholecystokinin-stimulated secretion of pancreatic acini by cell dehydration. *Pancreas*. 2000 Aug; 21(2):191-202.

Hashimoto D, Ohmuraya M, Wang J, Yamamura K, Hirota M, Baba H. Effect of low-molecular weight trypsin inhibitor, nafamostat mesilate, on trypsin activity using the pancreatic acinar cells. *Pancreas*. 2009 Jul; 38(5):595-7.

Hellermann GR, Nagy SB, Kong X, Lockey RF, Mohapatra SS. Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. *Respir Res*. 2002; 3:22.

Hietaranta AJ, Saluja AK, Bhagat L, Singh VP, Song AM, Steer ML. Relationship between NF-kappaB and trypsinogen activation in rat pancreas after supramaximal caerulein stimulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jan 12; 280(1):388-95.

Hirano T, Manabe T. Effect of ethanol on pancreatic lysosomes in rats: a possible mechanism for alcoholic pancreatitis. *Nihon Geka Hokan*. 1993 Jan 1; 62(1):16-23.

Hofbauer B, Saluja AK, Lerch MM, Bhagat L, Bhatia M, Lee HS, Frossard JL, Adler G, Steer ML. Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats. *Am J Physiol*. 1998 Aug; 275(2 Pt 1):G352-62.

Huang H, Liu Y, Daniluk J, Gaiser S, Chu J, Wang H, Li ZS, Logsdon CD, Ji B. Activation of Nuclear Factor-kB in Acinar Cells Increases the Severity of Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology*. 2013 Jan; 144(1):202-10.

Husain SZ, Grant WM, Gorelick FS, Nathanson MH, Shah AU. Caerulein-induced intracellular pancreatic zymogen activation is dependent on calcineurin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Jun; 292(6):G1594-9.

Husain SZ, Prasad P, Grant WM, Kolodecik TR, Nathanson MH, Gorelick FS. The ryanodine receptor mediates early zymogen activation in pancreatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 4; 102(40):14386-91.

Ito K, Miyashita Y, Kasai H. Micromolar and submicromolar Ca^{2+} spikes regulating distinct cellular functions in pancreatic acinar cells. *EMBO J* 16, 242-51, 2007.

Ji B, Gaiser S, Chen X, Ernst SA, Logsdon CD. Intracellular trypsin induces pancreatic acinar cell death but not NF-kappaB activation. *J Biol Chem*. 2009 Jun 26; 284(26):17488-98.

Jiang C, Zheng H, Liu S, Fang K. Relationship between carbachol hyperstimulation-induced pancreatic intracellular trypsinogen and NF-kappa B activation in rats in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2008 Feb; 28(1):69-72.

Jianyu-Hao, Guang-Li, Baosen-pang. Evidence for cigarette smoke-induced oxidative stress in the rat pancreas. *Inhal Toxicol*. 2009 Oct; 21(12):1007-12.

Kanno T. Intra- and Intercellular Ca^{2+} Signaling in Paraneurons and Other Secretory Cells. *Jpn J Physiol*. 1998 Aug; 48(4):219-27.

Katz M, Carangelo R, Miller LJ, Gorelick F. Effect of ethanol on cholecystokinin-stimulated zymogen conversion in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol*. 1996 Jan; 270(1 Pt 1):G171-5.

Klonowski-Stumpe H, Lüthen R, Han B, Sata N, Häussinger D, Niederau C. Inhibition of cathepsin B does not affect the intracellular activation of trypsinogen by cerulein hyperstimulation in isolated rat pancreatic acinar cells. *Pancreas*. 1998 Jan; 16(1):96-101.

Koch A, Giembycz M, Stirling RG, Lim S, Adcock I, Wassermann K, Erdmann E, Chung KF. Effect of smoking on MAP kinase-induced modulation of IL-8 in human alveolar macrophages. *Eur Respir J*. 2004 Jun; 23(6):805-12.

Krüger B, Albrecht E, Lerch MM. The role of intracellular calcium signaling in premature protease activation and the onset of pancreatitis. *Am J Pathol*. 2000 Jul; 157(1):43-50.

Kubisch CH, Logsdon CD. Secretagogues differentially activate endoplasmic reticulum stress responses in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Jun; 292(6):G1804-12.

Lam PP, Cosen Binker LI, Lugea A, Pandol SJ, Gaisano HY. Alcohol redirects CCK-mediated apical exocytosis to the acinar basolateral membrane in alcoholic pancreatitis. *Traffic*. 2007 May; 8(5):605-17.

Lankisch PG. Natural course of chronic pancreatitis. *Pancreatology*. 2001; 1(1):3-14.

Lau PP, Dubick MA, Yu GS, Morrill PR, Geokas MC. Dynamic changes of pancreatic structure and function in rats treated chronically with nicotine. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1990 Jul; 104(3):457-65.

Law R, Parsi M, Lopez R, Zuccaro G, Stevens T. Cigarette smoking is independently associated with chronic pancreatitis. *Pancreatology* 2010; 10:54-9.

Lee J, Hwan Kim K, Kim H. Role of vascular endothelial growth factor-D (VEGF-D) on IL-6 expression in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Jan; 1095:129-33.

Lerch MM, Albrecht E, Ruthenb rger M, Mayerle J, Halangk W, Krüger B. Pathophysiology of alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas*. 2003 Nov; 27(4):291-6.

Li X, Stark GR. NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp Hematol*. 2002 Apr; 30(4):285-96.

Lin Y, Tamakoshi A, Hayakawa T, Ogawa M, Ohno Y. Cigarette smoking as a risk factor for chronic pancreatitis: a case-control study in Japan. *Pancreas* 2000; 21:109-14.

Lindkvist B, Appelros S, Manjer J, Berglund G, Borgstrom A. A prospective cohort study of smoking in acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2008; 8(1):63-70.

Lindkvist B, Wierup N, Sundler F, Borgstr m A. Long-term nicotine exposure causes increased concentrations of trypsinogens and amylase in pancreatic extracts in the rat. *Pancreas*. 2008 Oct; 37(3):288-94.

Low JT, Shukla A, Thorn P. Int J Biochem Pancreatic acinar cell: new insights into the control of secretion. Cell Biol. 2010 Oct; 42(10):1586-9. Review.

Lu Z, Karne S, Kolodecik T, Gorelick FS. Alcohols enhance caerulein-induced zymogen activation in pancreatic acinar cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2002 Mar; 282(3):G501-7.

Lüthen R, Owen RL, Sarbia M, Grendell JH, Niederau C. Premature trypsinogen activation during cerulein pancreatitis in rats occurs inside pancreatic acinar cells. Pancreas. 1998 Jul; 17(1):38-43.

Maeda K, Hirota M, Kimura Y, Ichihara A, Ohmuraya M, Sugita H, Ogawa M. Proinflammatory role of trypsin and protease-activated receptor-2 in a rat model of acute pancreatitis. Pancreas. 2005 Jul; 31(1):54-62.

Maisonneuve P, Lowenfels AB, Müllhaupt B, Cavallini G, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andrén-Sandberg A, Domellöf L, Frulloni L, Ammann RW. Cigarette smoking accelerates progression of alcoholic chronic pancreatitis. Gut. 2005 Apr; 54(4):510-4)

Majumdar AP, Davis GA, Dubick MA, Geokas MC. Nicotine stimulation of protein secretion from isolated rat pancreatic acini. Am J Physiol. 1985 Feb; 248(2 Pt 1):G158-63.

Mandrekar P, Catalano D, White B, Szabo G. Moderate alcohol intake in humans attenuates monocyte inflammatory responses: inhibition of nuclear regulatory factor kappa B and induction of interleukin 10. Alcohol Clin Exp Res. 2006 Jan; 30(1):135-9.

Marrache F, Tu SP, Bhagat G, Pendyala S, Osterreicher CH, Gordon S, Ramanathan V, Penz-Osterreicher M, Betz KS, Song Z, Wang TC. Overexpression of interleukin-1beta in the murine pancreas results in chronic pancreatitis. Gastroenterology. 2008 Oct; 135(4):1277-87.

Masson E, Le Maréchal C, Delcenserie R, Chen JM, Férec C. Hereditary pancreatitis caused by a double gain-of-function trypsinogen mutation. *Hum Genet.* 2008 Jun; 123(5):521-9.

Messner B, Frotschnig S, Steinacher-Nigisch A, Winter B, Eichmair E, Gebetsberger J, Schwaiger S, Ploner C, Laufer G, Bernhard D. Apoptosis and necrosis: two different outcomes of cigarette smoke condensate-induced endothelial cell death. *Cell D Dis.* 2012 Nov 15; 3:e424.

Milnerowicz H, Sliwińska M, Jabłonowska M, Milnerowicz S. Effect of tobacco smoking on amylase activity in patients with pancreatitis. *Przegl Lek.* 2004; 61(10):1071-2.

Mooren FCh, Hlouschek V, Finkes T, Turi S, Weber IA, Singh J, Domschke W, Schnekenburger J, Krüger B, Lerch MM. Early changes in pancreatic acinar cell calcium signaling after pancreatic duct obstruction. *J Biol Chem.* 2003 Mar 14; 278(11):9361-9.

Mouret J: Contribution á l'étude des cellules glandulaires (pancreas). *J Anat Physiol* 1895, 31:221-236.

Muili KA, Ahmad M, Orabi AI, Mahmood SM, Shah AU, Molkentin JD, Husain SZ. Pharmacological and genetic inhibition of calcineurin protects against carbachol-induced pathological zymogen activation and acinar cell injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012 Apr 15; 302(8):G898-905.

Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg.* 1998 Jan; 175(1):76-83.

Okada N, Ohshio G, Tanaka T, Wang ZH, Doi R, Imamura M. Intracellular Ca²⁺ response of pancreatic acini in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Hepatogastroenterology.* 1998 May-Jun; 45(21):840-5.

Orabi AI, Shah AU, Ahmad MU, Choo-Wing R, Parness J, Jain D, Bhandari V, Husain SZ. Dantrolene mitigates caerulein-induced pancreatitis in vivo in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010 Jul; 299(1):G196-204.

Orabi AI, Shah AU, Muili K, Luo Y, Mahmood SM, Ahmad A, Reed A, Husain SZ. Ethanol enhances carbachol-induced protease activation and accelerates Ca²⁺ waves in isolated ratpancreatic acini. *J Biol Chem*. 2011 Apr 22; 286(16):14090-7.

Pandol SJ, Gukovsky I, Satoh A, Lugea A, Gukovskaya AS. Animal and in vitro models of alcoholic pancreatitis: role of cholecystokinin. *Pancreas*. 2003 Nov; 27(4):297-300.

Pandol SJ, Lugea A, Mareninova OA, Smoot D, Gorelick FS, Gukovskaya AS, Gukovsky I. Investigating the pathobiology of alcoholic pancreatitis. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011 May; 35(5):830-7.

Pandol SJ, Raraty M. Pathobiology of alcoholic pancreatitis. *Pancreatology*. 2007; 7(2-3):105-14.

Petersen OH, Gerasimenko OV, Gerasimenko JV. Pathobiology of acute pancreatitis: focus on intracellular calcium and calmodulin. *F1000 Med Rep*. 2011; 3:15.

Petersen OH, Gerasimenko OV, Tepikin AV, Gerasimenko JV. Aberrant Ca(2+) signalling through acidic calcium stores in pancreatic acinar cells. *Cell Calcium*. 2011 Aug; 50(2):193-9. Review.

Petersen OH, Michalak M, Verkhatsky A. Calcium signalling: past, present and future. *Cell Calcium*. 2005 Sep-Oct; 38(3-4):161-9.

Petersen OH, Sutton R. Ca²⁺ signalling and pancreatitis: effects of alcohol, bile and coffee. *Trends Pharmacol Sci*. 2006 Feb; 27(2):113-20.

Pickett JA, Campos-Toimil M, Thomas P, Edwardson JM. Identification of SNAREs that mediate zymogen granule exocytosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Aug 3; 359(3):599-603.

Preciado D, Kuo E, Ashktorab S, Manes P, Rose M. Cigarette smoke activates NFκB-mediated Tnf-α release from mouse middle ear cells. *Laryngoscope*. 2010 Dec; 120(12):2508-15.

Rinderknecht, H. Pancreatic secretory enzymes. in *The Pancreas: Biology, Pathobiology, and Disease* 2nd edn. (eds Go, V.L. et al.) 219–251 (Raven Press, New York, 1993).

Rivera-Barreno R, del Castillo-Vaquero A, Salido GM, González A. Effect of cinnamtannin B-1 on cholecystokinin-8-evoked responses in mouse pancreatic acinar cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010 Oct; 37(10):980-8.

Romac JM, Shahid RA, Choi SS, Karaca GF, Westphalen CB, Wang TC, Liddle RA. Pancreatic secretory trypsin inhibitor I reduces the severity of chronic pancreatitis in mice overexpressing interleukin-1 β in the pancreas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012 Mar 1; 302(5):G535-41.

Rosado JA, González A, Salido GM, Pariente JA. Effects of reactive oxygen species on actin filament polymerisation and amylase secretion in mouse pancreatic acinar cells. *Cell Signal*. 2002 Jun; 14(6):547-56.

Ross, M., Pawlina W. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2007.

Sah RP, Chari ST. Autoimmune pancreatitis: an update on classification, diagnosis, natural history and management. *Curr Gastroenterol Rep*. 2012 Apr; 14(2):95-105.

Saluja AK, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Frossard JL, Steer ML. Secretagogue-induced digestive enzyme activation and cell injury in rat pancreatic acini. *Am J Physiol*. 1999 Apr; 276(4 Pt 1):G835-42.

Saluja AK, Bhagat L. Pathophysiology of alcohol-induced pancreatic injury. *Pancreas*. 2003 Nov; 27(4):327-31.

Saluja AK, Donovan EA, Yamanaka K, Yamaguchi Y, Hofbauer B, Steer ML. Cerulein-induced in vitro activation of trypsinogen in rat pancreatic acini is mediated by cathepsin B. *Gastroenterology*. 1997 Jul; 113(1):304-10.

Saluja AK, Lerch MM, Phillips PA, Dudeja V. Why does pancreatic overstimulation cause pancreatitis? *Annu Rev Physiol*. 2007; 69:249-69.

San Román JI, De Dios I, Manso MA, Calvo JJ, López MA. Caerulein-induced acute pancreatitis in the rat. Pancreatic secretory response to cholecystokinin. Arch Int Physiol Biochim. 1990 Oct; 98(5):237-43.

Sánchez-Bernal C., San Román García J.I., López Rodríguez, Calvo Andrés. Fisiología y bioquímica del páncreas. En: Navarro S., Pérez-Mateo M., Guarner L. (ed). Tratado de páncreas exocrino. Barcelona: J&C Ediciones Médicas, 2002. p. 11-34.

Sancho V, Berna MJ, Thill M, Jensen RT. PKC θ activation in pancreatic acinar cells by gastrointestinal hormones/neurotransmitters and growth factors is needed for stimulation of numerous important cellular signaling cascades. Biochim Biophys Acta. 2011 December; 1813(12): 2145–2156.

Sandoval D, Gukovskaya A, Reavey P, Gukovsky S, Sisk A, Braquet P, Pandol SJ, Poucell-Hatton S. The role of neutrophils and platelet-activating factor in mediating experimental pancreatitis. Gastroenterology. 1996 Oct; 111(4):1081-91.

Sanfey H, Sarr MG, Bulkley GB, Cameron JL. Oxygen-derived free radicals and acute pancreatitis: a review. Acta Physiol Scand Suppl. 1986; 548:109-18.

Sata N, Klonowski-Stumpe H, Han B, Lüthen R, Häussinger D, Niederau C. Supraphysiologic concentrations of cerulein induce apoptosis in the rat pancreatic acinar cell line AR4-2J. Pancreas. 1999 Jul; 19(1):76-82.

Satoh A, Gukovskaya AS, Reeve JR Jr, Shimosegawa T, Pandol SJ. Ethanol sensitizes NF- κ B activation in pancreatic acinar cells through effects on protein kinase C- ϵ . Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006 Sep; 291(3):G432-8.

Schoenberg MH, Büchler M, Beger HG. Oxygen radicals in experimental acute pancreatitis. Hepatogastroenterology. 1994 Aug; 41(4):313-9.

Sendler M, Dummer A, Weiss FU, Krüger B, Wartmann T, Scharffetter-Kochanek K, van Rooijen N, Malla SR, Aghdassi A, Halangk W, Lerch MM, Mayerle J. Tumour necrosis factor α secretion induces protease activation and acinar cell necrosis in acute experimental pancreatitis in mice. Gut. 2012 Apr 5.

Shah AU, Sarwar A, Orabi AI, Gautam S, Grant WM, Park AJ, Shah AU, Liu J, Mistry PK, Jain D, Husain SZ. Protease activation during in vivo pancreatitis is dependent on calcineurin activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009 Nov; 297(5):G967-73.

Siegmund E, Lüthen F, Kunert J, Weber H. Ethanol modifies the actin cytoskeleton in rat pancreatic acinar cells--comparison with effects of CCK. *Pancreatology*. 2004; 4(1):12-21.

Singer MV. Effect of ethanol and alcoholic beverages on the gastrointestinal tract in humans. *Rom J Gastroenterol*. 2002 Sep; 11(3):197-204.

Sliwińska-Mossoń M, Milnerowicz H. [Influence of tobacco smoking on lipase activity in patients with pancreatitis]. *Przegl Lek*. 2005; 62(10):1058-61.

Stevens T, Conwell DL, Zuccaro G. Pathogenesis of chronic pancreatitis: an evidence-based review of past theories and recent developments. *Am J Gastroenterol*. 2004 Nov; 99(11):2256-70.

Strate T, Knoefel WT, Yekebas E, Izbicki JR. Chronic pancreatitis: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Int J Colorectal Dis*. 2003 Mar; 18(2):97-106.

Sutton R, Petersen OH, Pandol SJ. Pancreatitis and calcium signalling: report of an international workshop. *Pancreas*. 2008, 36: e1-14

Suzuki H, Suematsu M, Miura S, Asako H, Kurose I, Ishii H, Houzawa S, Tsuchiya M. Xanthine oxidase-mediated intracellular oxidative stress in response to cerulein in rat pancreatic acinar cells. *Pancreas*. 1993 Jul; 8(4):465-70.

Sweiry JH, Shibuya I, Asada N, Niwa K, Doolabh K, Habara Y, Kanno T, Mann GE. Acute oxidative stress modulates secretion and repetitive Ca²⁺ spiking in rat exocrine pancreas. *Biochim Biophys Acta*. 1999 May 31; 1454(1):19-30.

Szabo G, Mandrekar P, Oak S, Mayerle J. Effect of ethanol on inflammatory responses. Implications for pancreatitis. *Pancreatology*. 2007; 7(2-3):115-23.

Tak PP, Firestein GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*. 2001 Jan; 107(1):7-11.

Tamizhselvi R, Sun J, Koh YH, Bhatia M. Effect of hydrogen sulfide on the phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase B pathway and on caerulein-induced cytokine production in isolated mouse pancreatic acinar cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009 Jun; 329(3):1166-77.

Tapia JA, Salido GM, González A. Ethanol consumption as inductor of pancreatitis. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2010 Feb 6; 1(1):3-8.

Thomas GA, Rhodes J, Ingram JR. Mechanisms of disease: nicotine--a review of its actions in the context of gastrointestinal disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2005 Nov; 2(11):536-44.

Thomas P, Bagrij T, Campos-Toimil M, Edwardson JM. Mitochondria play a critical role in shaping the exocytotic response of rat pancreatic acinar cells. *Cell Calcium*. 2006 Jan; 39(1):57-63.

Tolstrup JS, Kristiansen L, Becker U, Grønbaek M. Smoking and risk of acute and chronic pancreatitis among women and men: a population-based cohort study. *Arch Intern Med* 2009; 169:603-9.

Tortora G, Derrickson B. *Principios de anatomía y fisiología*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2006.

Van Acker GJ, Saluja AK, Bhagat L, Singh VP, Song AM, Steer ML. Cathepsin B inhibition prevents trypsinogen activation and reduces pancreatitis severity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002 Sep; 283(3):G794-800.

Van Acker GJ, Weiss E, Steer ML, Perides G. Cause-effect relationships between zymogen activation and other early events in secretagogue-induced acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Jun; 292(6):G1738-46.

Vecchio D, Arezzini B, Pecorelli A, Valacchi G, Martorana PA, Gardi C. Reactivity of mouse alveolar macrophages to cigarette smoke is strain dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010 May; 298(5):L704-13.

Vonlaufen A, Wilson JS, Pirola RC, Apte MV. Role of alcohol metabolism in chronic pancreatitis. *Alcohol Res Health*. 2007; 30(1):48-54.

Wang YL, Hu R, Lugea A, Gukovsky I, Smoot D, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Ethanol feeding alters death signaling in the pancreas. *Pancreas*. 2006 May; 32(4):351-9.

Ward JB, Petersen OH, Jenkins SA, Sutton R. Is an elevated concentration of acinar cytosolic free ionised calcium the trigger for acute pancreatitis? *Lancet*. 1995 Oct 14; 346(8981):1016-9. Review.

Ward JB, Sutton R, Jenkins SA, Petersen OH. Progressive disruption of acinar cell calcium signaling is an early feature of cerulein-induced pancreatitis in mice. *Gastroenterology*. 1996 Aug; 111(2):481-91.

Weber H, Roesner JP, Nebe B, Rychly J, Werner A, Schröder H, Jonas L, Leitzmann P, Schneider KP, Dummier W. Increased cytosolic Ca²⁺ amplifies oxygen radical-induced alterations of the ultrastructure and the energy metabolism of isolated rat pancreatic acinar cells. *Digestion*. 1998; 59(3):175-85.

Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, *et al.* "Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene". *Nat. Genet.* October 1996. 14 (2): 141–5

Wickenden JA, Clarke MC, Rossi AG, Rahman I, Faux SP, Donaldson K, MacNee W. Cigarette smoke prevents apoptosis through inhibition of caspase activation and induces necrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 Nov; 29(5):562-70.

Willems PH, Van Emst-De Vries SE, Van Os CH, De Pont JJ. Dose-dependent recruitment of pancreatic acinar cells during receptor-mediated calcium mobilization. *Cell Calcium*. 1993, 14: 145-59.

Williams JA. Regulation of acinar cell function in the pancreas. *Curr Opin Gastroenterol*. 2010 Sep; 26(5):478-83.

Wilson JS, Apte MV. Role of alcohol metabolism in alcoholic pancreatitis. *Pancreas*. 2003 Nov; 27(4):311-5.

Witt H, Apte MV, Keim V, Wilson JS. Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology*. 2007 Apr; 132(4):1557-73.

Witt H, Bhatia E. Genetic aspects of tropical calcific pancreatitis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2008 Sep; 9(3):213-26.

Wittel UA, Bachem M, Siech M. Oxygen radical production precedes alcohol-induced acute pancreatitis in rats. *Pancreas*. 2003 May; 26(4):e74-80.

Wittel UA, Pandey KK, Andrianifahanana M, Johansson SL, Cullen DM, Akhter MP, Brand RE, Prokopczyk B, Batra SK. Chronic pancreatic inflammation induced by environmental tobacco smoke inhalation in rats. *Am J Gastroenterol*. 2006 Jan; 101(1):148-59.

Wu D, Zhai Q, Shi X. Alcohol-induced oxidative stress and cell responses. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006 Oct; 21 Suppl 3:S26-9.

Yadav D, Hawes RH, Brand RE, Anderson MA, Money ME, Banks PA et al. Alcohol consumption, cigarette smoking, and the risk of recurrent acute and chronic pancreatitis. *Arch Intern Med* 2009; 169:1035-45.

Yadav D, Whitcomb DC. The role of alcohol and smoking in pancreatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010 Mar; 7(3):131-45.

Yu JH, Kim H, Kim KH. Calcium-dependent apoptotic gene expression in cerulein-treated AR42J cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Dec; 1010:66-9.

Yuan J, Lugea A, Zheng L, Gukovsky I, Edderkaoui M, Rozengurt E, Pandol SJ. Protein kinase D1 mediates NF-kappaB activation induced by cholecystokinin and cholinergic signaling in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008 Dec; 295(6):G1190-201.